

Université de Sherbrooke

Antigénicité de l'ARN Ro hY5

par

Carole Boulanger

Département de Microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.)

Décembre 1993



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-89949-2

Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
RÉSUMÉ	VIII
 INTRODUCTION	 1
1.1 MÉCANISMES DE PRODUCTION DES AUTOANTICORPS	3
1.2 PATHOGÉNICITÉ DES AUTOANTICORPS	4
1.3 CARACTÉRISATION DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro	6
1.4 ANTIGÉNICITÉ DES RIBONUCLÉOPROTÉINES Ro	11
1.5 AUTOANTICORPS ANTI-ARN	12
1.6 PERTINENCE DE LA RECHERCHE	14
1.7 OBJECTIFS DE RECHERCHE	16
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	 17
2.1 CARACTÉRISATION DES SÉRUMS	17
2.2 CULTURE DE CELLULES ET MARQUAGE AU ³² P-ORTHOPHOSPHATE	17
2.3 PRÉPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES	17

2.4	IMMUNOPRÉCIPITATION	18
2.5	ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'URÉE-POLYACRYLAMIDE	19
2.6	CLONAGE DE L'ADNc DE L'ARN hY5	19
	2.6.1 Production de l'ADNc correspondant à l'ARN hY5	19
	2.6.2 Production d'ADN recombinant	20
	2.6.3 Séquençage de l'ADN	20
2.7	SOUS-CLONAGE DE L'ADNc	23
	2.7.1 Production du pY5-84	23
	2.7.2 Production du pY5-80	26
2.8	SYNTHÈSE <i>IN VITRO</i> ET PURIFICATION DES ARN	26
2.9	DIGESTION À LA RIBONUCLÉASE T1	27
2.10	GEL DE RÉTENTION	28
2.11	PRÉDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN	29
RÉSULTATS		30
3.1	RECONNAISSANCE SPÉCIFIQUE DE L'ARN hY5 PAR DES AUTOANTICORPS	30
3.2	COMPARAISON DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN Ro	33
3.3	CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT À L'ARN hY5	33
3.4	L'ARN Y5-125, UN MUTANT DE L'ARN hY5	34

3.5	RECONNAISSANCE DES ARN SYNTHÉTISÉS <i>IN VITRO</i>	39
3.6	IDENTIFICATION DE SÉRUMS RECONNAISSANT L'ARN hY5	39
3.7	DÉFINITION DE L'ÉPITOPE PAR FRAGMENTATION DE L'ARN hY5	46
3.8	RECONNAISSANCE DES ARN MUTANTS Y5-Alu I ET Y5-Hha I	53
3.9	COMPARAISON DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR LES ANTICORPS ANTI-ARN hY5 DES SÉRUMS JW ET MD	53
3.10	COMPARAISON DES ÉPITOPES PRÉSENTS SUR LES ARN Y5-84 ET Y5-Hha I	56
3.11	SITUATION DE L'ÉPITOPE SUR L'ARN hY5 ET RECONNAISSANCE DE L'ARN Y5-80	59
	DISCUSSION	64
	REMERCIEMENTS	73
	RÉFÉRENCES	74
	ANNEXE 1	81

LISTE DES FIGURES

FIGURES	PAGE
1. Structure secondaire des ARN Ro.	8
2. Schéma de pY5-125 et des ARN produits à l'aide de ce plasmide.	21
3 A. Schéma de pY5-84 et des ARN produits à l'aide de ce plasmide.	24
3 B. Le plasmide pY5-80.	24
4. Immunoprécipitation des RNP Ro et de l'ARN hY5.	31
5. Séquençage de l'ADN des plasmides pY5-125 et pY5-84.	35
6. Schéma des structures secondaires prédites des ARN Y5-84 et Y5-125.	37
7. Immunoprécipitation spécifique de l'ARN Y5-84 par les sérums du patient JW.	40
8 A. Immunoprécipitation d'ARN cellulaires par les 5 sérums anti-ARN hY5.	43
8 B. Immunoprécipitation d'ARN produits <i>in vitro</i> par les 5 sérums anti-ARN hY5.	43
9. Immunoprécipitation de fragments de l'ARN Y5-84 obtenus par digestion à la ribonucléase T1.	47
10. Identification des fragments de 27 et de 31 nt reconnus par le sérum JW.	49
11. Localisation des fragments de 27 et de 31 nt sur la structure secondaire de l'ARN hY5.	51

12 A. Immunoprécipitation des ARN mutants Y5-Alu I et Y5-Hha I par les sérums JW et MD.	54
12 B. Immunoprécipitation de fragments de l'ARN Y5-84 produits par digestion à la ribonucléase T1.	54
13. Spécificité et compétition de la liaison entre l'ARN Y5-84 et l'anticorps anti-ARN hY5 sur gel de rétention.	57
14. Schéma représentant l'épitope de l'ARN hY5 reconnu par les anticorps anti-ARN hY5.	60
15 A. Séquençage de l'ADN du plasmide pY5-80.	62
15 B. Immunoprécipitation comparée des ARN transcrits à partir de pY5-84 et de pY5-80.	62

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	PAGE
I. Identification des sérums comportant des autoanticorps anti-ARN hY5.	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BSA	Albumine bovine
cm	Centimètre
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
IgG	Immunoglobuline de classe G
kD	KiloDalton
LED	Lupus érythémateux disséminé
M	Molaire
mCi	MilliCurie
mg	Milligramme
min.	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pmole	Picomole
RNP	Ribonucléoprotéine
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
sec.	Seconde
SHN	Sérum humain normal
SS	Syndrome de Sjögren
SSA	Antigène A du Syndrome de Sjögren
SSB	Antigène B du Syndrome de Sjögren
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris	Hydroxyméthyl-aminométhane
U	Unité
UV	Ultraviolet
°C	Degré celsius
μCi	MicroCurie
μg	Microgramme
μl	Microlitre

RÉSUMÉ

Antigénicité de l'ARN Ro hY5

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.).

Les personnes atteintes de collagénoses développent fréquemment des autoanticorps qui reconnaissent les RNP (ribonucléoprotéines) Ro. Les RNP Ro sont des composantes cellulaires de faible abondance dont on ne connaît pas encore la fonction biologique. Elles sont formées par l'association d'un ARN Ro: hY1, hY3, hY4 ou hY5 à au moins une des trois protéines: 60 kD Ro, 52 kD Ro et La. Les autoanticorps présents dans les sérums anti-Ro sont habituellement dirigés contre les protéines Ro. Nous avons identifié des sérums anti-Ro qui contiennent également des autoanticorps dirigés spécifiquement contre l'ARN hY5 des RNP Ro^{hY5}. Il s'agit d'une nouvelle spécificité antigénique parmi les sérums anti-Ro et les sérums anti-ARN.

La prévalence de cette nouvelle spécificité parmi les sérums contenant des anticorps anti-Ro a été évaluée à 10 %. En analysant 52 sérums anti-Ro provenant de différents patients, 5 sérums anti-ARN hY5 ont été identifiés. Deux de ces sérums, JW et MD, sont très spécifiques puisqu'ils ne reconnaissent pas d'autres ARN et ils ont été choisis pour étudier l'antigénicité de l'ARN hY5. Chez le patient JW, les autoanticorps anti-ARN hY5 sont présents dès le début de la maladie et l'analyse de plusieurs prélèvements indique que le titre de ces anticorps fluctue en fonction du temps.

L'ADNc correspondant à l'ARN hY5 a été cloné et utilisé pour produire *in vitro* l'ARN hY5 et divers mutants de cet ARN. Ces différents transcrits ont permis de définir partiellement le déterminant antigénique reconnu par les anticorps anti-ARN hY5. L'antigénicité de l'ARN hY5 est abolie lorsque des séquences supplémentaires sont ajoutées aux deux extrémités de l'ARN et lorsque l'ARN hY5, préalablement fragmenté à la ribonucléase T1, est dénaturé à la chaleur. Ces observations suggèrent un épitope conformationnel, puisque la structure secondaire des ARN est modifiée dans ces deux situations.

Pour localiser l'épitope, l'ARN hY5 fragmenté par la ribonucléase T1 ainsi que des ARN mutants ont été utilisés en immunoprécipitation. L'ensemble des résultats obtenus suggère que les anticorps anti-ARN hY5 reconnaissent un épitope situé au centre de l'ARN hY5 excluant la partie supérieure de la molécule et le site de liaison de la protéine Ro 60 kD. L'extrémité 3' de l'ARN, qui comprend le site d'attachement de la protéine La, participerait au maintien de l'épitope en se liant directement à l'anticorps ou en stabilisant une structure favorable à la reconnaissance par les anticorps. La localisation de ce déterminant antigénique suggère également que les autoanticorps anti-ARN hY5 seraient produits par un mécanisme d'immunisation directe par l'antigène, soit la RNP Ro^{hY5} intacte.

1. INTRODUCTION

Le système immunitaire a pour rôle de défendre l'organisme contre la multitude d'agents pathogènes qui l'entourent. Pour accomplir cette tâche, il doit tout d'abord discriminer entre les molécules du soi et les molécules étrangères et ensuite développer une réponse efficace contre l'agresseur. Le système immunitaire doit donc reconnaître les composantes de l'organisme qu'il protège sans pour autant réagir contre elles, il doit donc être "tolérant" envers le soi. Lorsqu'il y a rupture de tolérance, ceci entraîne le développement de maladies autoimmunes. Cependant, certaines réactions dirigées contre le soi font partie des fonctions normales du système immunitaire. L'autoimmunité survient lorsque la régulation de ces fonctions est perturbée (Robinson, 1987; Roitt, 1991).

Les maladies autoimmunes sont d'étiologie inconnue et elles sont classifiées selon la localisation des lésions qu'elles provoquent. Elles forment un large spectre ayant, à une extrémité, les maladies spécifiques à un organe comme la thyroïdite de Hashimoto et, à l'autre extrémité, les maladies non spécifiques d'organe ou systémiques comme le lupus érythémateux disséminé (LED). Ce dernier groupe appartient à la classe des maladies rhumatismales ou collagénoses (Roitt, 1991).

La production d'autoanticorps est une des manifestations typiques des maladies autoimmunes. Les autoanticorps reconnaissent des composantes cellulaires très variées (ADN, ribonucléoprotéines, protéines structurales, enzymes, etc.) qui sont distribuées tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. La majorité des autoanticorps

servent de marqueurs sérologiques de la maladie puisque la spécificité antigénique est généralement associée à une maladie en particulier ou à un groupe restreint de maladies. L'identification des autoanticorps présents dans un sérum permet donc de confirmer un diagnostic (Tan, 1989).

Notre équipe de recherche s'intéresse particulièrement à un groupe restreint d'autoanticorps qui reconnaît la RNP (ribonucléoprotéine) Ro. Cette composante cellulaire mineure est fréquemment reconnue par les anticorps des personnes souffrant de collagénoses (Slobbe et al., 1991; Harley et al., 1992; Chan et Andrade, 1992; Tan, 1989). Les anticorps anti-Ro sont détectés principalement chez les personnes atteintes du SS (Syndrome de Sjögren) et du LED à des fréquences respectives de 40 à 95% (selon la technique utilisée) et de 40% (Harley et al., 1992). L'étude de l'antigénicité de la RNP Ro vise essentiellement à développer de meilleurs outils diagnostiques et à connaître les mécanismes par lesquels ces autoanticorps sont produits. L'information concernant l'immunogénicité de la RNP Ro pourrait fournir de nouveaux éléments permettant la compréhension des phénomènes qui induisent l'autoimmunité (Whittingham, 1992). D'autre part, les anticorps anti-Ro, qui ont d'ailleurs permis l'identification de la RNP Ro, servent actuellement à caractériser cette particule dont la fonction biologique n'est pas encore connue. Plus particulièrement, ils permettent l'étude des interactions qui se produisent au sein de la RNP Ro (Slobbe et al., 1992; Pruijn et al., 1991).

Jusqu'à maintenant, des anticorps reconnaissant exclusivement les protéines de la RNP Ro avaient été identifiés. Récemment, nous avons identifié un sérum contenant à la fois des anticorps dirigés contre les

protéines Ro et des anticorps dirigés contre un des ARN constituant de ces RNP soit, l'ARN hY5. Les autoanticorps anti-ARN hY5 représentent une nouvelle spécificité antigénique du groupe des anti-Ro et du groupe des anti-ARN. Dans la présente étude, nous avons caractérisé ces autoanticorps anti-ARN hY5 dans le but de définir plus précisément l'épitope qu'ils reconnaissent sur l'ARN hY5.

1.1 MÉCANISMES DE PRODUCTION DES AUTOANTICORPS

Selon Dziarski, les autoanticorps seraient produits par deux mécanismes différents, soit par une activation polyclonale non spécifique des lymphocytes B qui implique une sécrétion d'anticorps sans stimulation par un antigène, soit par une immunisation directe avec un composé endogène ou exogène (Dziarski, 1988). Lorsque l'immunogène est une substance étrangère, les composés du soi sont alors reconnus par mimétisme moléculaire. Plusieurs données indiquent une certaine sélection des autoantigènes favorisant le mécanisme d'immunisation directe par l'antigène. L'ensemble des autoantigènes ne représente qu'une faible proportion de tous les composés présents dans une cellule. Les autoanticorps présents chez un individu ne reconnaissent que quelques autoantigènes souvent associés dans la cellule et la spécificité antigénique est habituellement restreinte à une seule ou à quelques maladies (Hardin, 1986; Tan, 1989).

En considérant la spécificité et la grande affinité avec lesquelles les anticorps anti-Ro reconnaissent leur antigène, il est difficile d'envisager que le mécanisme d'activation polyclonale non spécifique des lymphocytes B joue un rôle important dans leur production. De plus, la coexistence dans un même sérum des anticorps anti-Ro et anti-La

supporte le modèle d'immunisation directe par l'antigène. D'une part, les protéines qui sont reconnues par ces anticorps se distinguent antigéniquement, indiquant qu'il ne s'agit pas de réactions croisées et, d'autre part, ces anticorps reconnaissent des protéines associées *in vivo* au sein des RNP Ro. Il est aussi peu probable que la reconnaissance simultanée des différentes protéines de la RNP Ro soit attribuable au mimétisme moléculaire. Ces observations suggèrent que l'antigène Ro serait l'immunogène responsable de la production des anti-Ro. Toutefois, l'hypothèse du mimétisme moléculaire ne peut être rejetée actuellement en considérant le fait qu'un autoantigène puisse servir à la maturation d'une réponse immune induite initialement par une molécule exogène.

1.2 PATHOGÉNICITÉ DES AUTOANTICORPS

La localisation de l'antigène est le critère le plus déterminant du potentiel pathogénique des autoanticorps, si l'on admet qu'il est peu probable que les anticorps puissent entrer dans les cellules intactes pour les endommager. De façon générale, un anticorps qui reconnaît un antigène exprimé à la surface cellulaire sera pathogénique alors qu'un anticorps dirigé contre un constituant intracellulaire ne le sera pas. Lorsque l'antigène intracellulaire est libéré de la cellule ou transporté à la surface cellulaire en réponse à certains stimuli, il devient accessible et par conséquent, l'anticorps correspondant peut devenir pathogénique (Tan, 1991; Naparstek et Plotz, 1993). Les anticorps anti-Ro ne devraient pas être pathogéniques puisque la RNP Ro est une composante intracellulaire. Toutefois, une expression de l'antigène Ro au niveau de la surface des cellules a déjà été observée (Furukawa et al., 1990; Furukawa et al., 1988; Lee et al., 1985) et pourrait expliquer en partie les évidences indirectes de pathogénicité des anticorps anti-Ro qui ont été rapportées.

Les anticorps anti-Ro sont détectés chez plus des deux tiers des personnes atteintes de lupus érythémateux cutané subaigu, une maladie exacerbée par les rayons ultraviolet (UV). Il a été démontré qu'une exposition à la lumière UV (LeFeber et al., 1984) ou un traitement à l'estradiol (Furukawa et al., 1988) entraînent l'expression de l'antigène Ro à la membrane cellulaire de kératinocytes en culture. Afin d'étudier la pathogénicité des anticorps anti-Ro en rapport à l'exposition aux UV, un modèle animal a été développé dans lequel de la peau humaine a été greffée à une souris immunodéficiente qui a reçu par la suite des anticorps anti-Ro par immunisation passive (Lee et al., 1986). Des dépôts d'anticorps se sont formés sur la peau humaine greffée et non sur celle de la souris hôte lorsque ces animaux étaient préalablement exposés aux UV. De plus, la déposition des anticorps anti-Ro était proportionnelle à la dose d'irradiation. Ce modèle animal qui reproduit les manifestations cliniques de la maladie suggère donc un rôle pathologique des anticorps anti-Ro (Lee et al., 1989).

Les anticorps anti-Ro ont aussi été clairement associés au syndrome du lupus néonatal du fait qu'ils sont toujours présents dans le sérum des mères des enfants atteints. Il a été suggéré que les anticorps anti-Ro maternels traversant le placenta sont la cause des manifestations hématologiques et cutanées observées chez les nouveau-nés puisque ces manifestations disparaissent à mesure que les anticorps maternels (IgG) sont éliminés de la circulation sanguine de l'enfant (Buyon et Winchester, 1990). Certains de ces nouveau-nés souffrent d'un bloc atrioventriculaire cardiaque congénital et des dépôts d'anticorps maternels ont été détectés dans les tissus cardiaques de ces enfants (Lee et al., 1985). Cependant, bien que ces anticorps anti-Ro pourraient provoquer les symptômes de la

maladie, ils ne peuvent être les seuls en cause puisque des mères possédant ces anticorps ont aussi donné naissance à des enfants normaux.

1.3 CARACTÉRISATION DE LA RNP Ro

Par la technique d'immunodiffusion, Clark et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois la spécificité anti-Ro en utilisant des fractions solubles d'un extrait de rate humaine (Clark et al. 1969). La spécificité anti-La a été identifiée par la suite parmi les sérums anti-Ro (Mattioli et Reichlin, 1974). Plus tard, une autre équipe a décrit les antigènes SSA et SSB chez des patients atteints du SS (Alspaugh et Tan, 1975) et une collaboration entre laboratoires a finalement permis de déterminer que les antigènes Ro et SSA étaient identiques alors que l'antigène La correspondait à l'antigène SSB (Alspaugh et Maddison, 1979).

Lorsque les sérums anti-Ro ont été utilisés pour la première fois dans des expériences d'immunoprécipitation, l'autoantigène Ro a pu être identifié comme étant une RNP (Lerner et al., 1981). Cette technique a révélé la présence dans les cellules humaines de 5 petits ARN d'une taille variant de 84 à 112 nucléotides, nommés hY1 à hY5 pour leur origine humaine (h) et cytoplasmique (y) (Hendrick et al., 1981). Le séquençage de l'ARN hY5 a démontré qu'il s'agissait d'une molécule de 83 ou 84 nt de longueur, riche en uridine (38%) et sans base modifiée (Kato et al., 1982). Le clonage des gènes des ARN hY1 et hY3 a révélé que ces ARN transcrits par l'ARN-polymérase III sont codés par des gènes adjacents qui sont présents en une seule copie dans le génome humain. Ces résultats de Wolin et Steitz (1983) ont aussi démontré que les ARN hY1, hY3 et hY5 présentent une grande homologie entre eux et que l'ARN hY2 est une forme tronquée de l'ARN hY1. Il est à noter que plus tard, les ADNc des ARN hY4 et hY5 ont aussi été clonés (O'Brien et Harley, 1990; Pruijn et al., 1991).

La structure secondaire prédite des ARN hY1 à hY5 est présentée à la Figure 1.

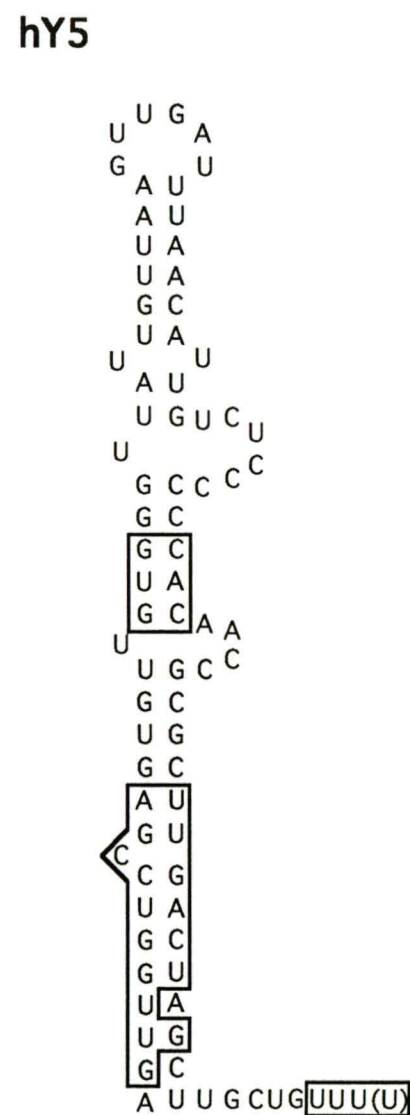
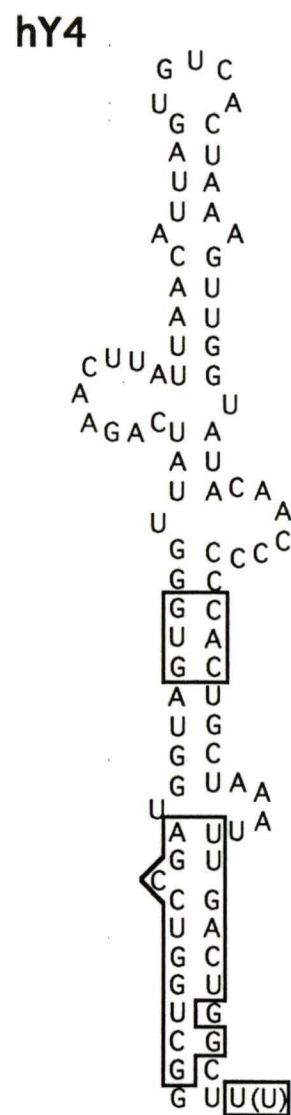
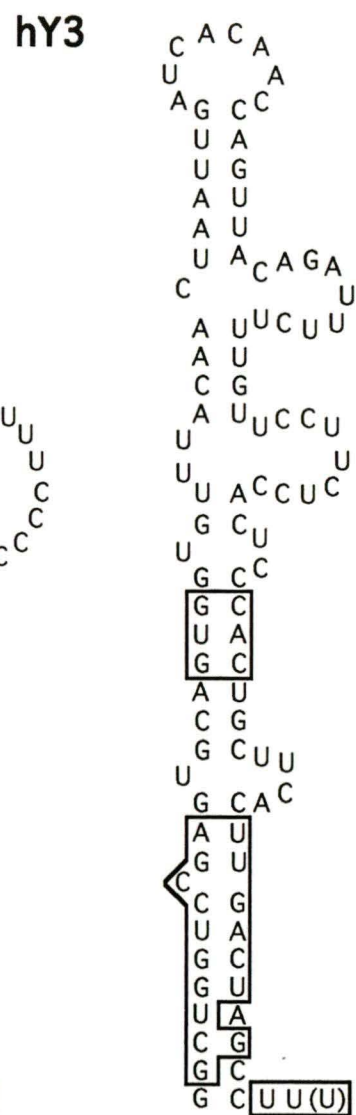
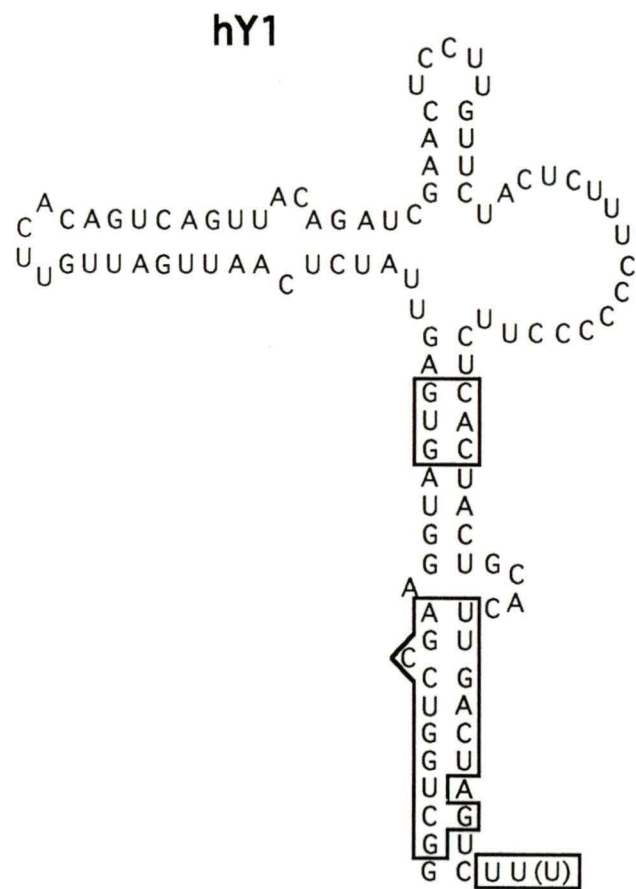
Un polypeptide de 60 kD constitue la composante protéique majeure de la RNP Ro. Il se lie à un site très conservé des ARN hY1 à hY5 qui est formé par l'appariement des extrémités 5' et 3' (Wolin et Steitz, 1984; Pruijn et al., 1991). À l'aide d'autoanticorps anti-Ro, deux équipes ont isolé l'ADNc humain de ce polypeptide et ont montré que les deux clones sont identiques sauf pour une courte séquence en C-terminal (Deutscher et al., 1988; Ben-Chetrit et al., 1989). Les protéines Ro 60 kD seraient donc formées d'une séquence de 538 ou 525 acides aminés comportant un motif RNP-80 présent chez plusieurs protéines liant l'ARN et possiblement une structure en doigt de zinc similaire à celle observée chez les protéines liant l'ADN.

L'autoantigène La est également une RNP (Lerner et Steitz, 1981). La protéine La est un polypeptide de 50 kD qui s'associe aux ARN Ro ainsi qu'à tous les autres transcrits de l'ARN-polymérase III (Hendrick et al., 1981). Elle se lie également à certains ARN viraux (Lerner et al., 1981; Pizer et al., 1983). Une courte séquence d'uridines à l'extrémité 3' de ces ARN constitue le site d'attachement de la protéine La (Stefano, 1984). L'analyse de la séquence polypeptidique y a révélé la présence d'un motif RNP-80, seule structure homologue à la protéine Ro 60 kD (Chambers et al., 1988). La protéine La est une phosphoprotéine localisée dans le noyau (Hendrick et al., 1981) et impliquée dans la terminaison de la transcription par l'ARN-polymérase III (Gottlieb et Steitz, 1989). En fait, la protéine La est associée de façon stable aux RNP Ro (Boire et Craft, 1990) et forme une sous-classe de RNP Ro (Mamula et al., 1989b).

Figure 1. Structure secondaire des ARN Ro

Pour évaluer la structure secondaire la plus probable adoptée par chaque ARN Ro, les séquences des ARN hY1, hY3 (Wolin et Steitz, 1983), hY4 (O'Brien et Harley, 1990) et hY5 (Kato et al., 1982) ont été traitées par ordinateur à l'aide du programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981). Les séquences encadrées représentent les régions conservées entre les ARN Ro humains. La plus grande de ces trois régions comprend le site de liaison de la protéine Ro 60 kD.

(): indique que le nucléotide n'est pas toujours
 présent



Plus récemment, une troisième protéine Ro a été caractérisée par immunobuvardage (Ben-Chetrit et al., 1988). Il s'agit d'un polypeptide de 52 kD qui se distingue immunologiquement et biochimiquement des protéines Ro 60 kD et La. L'ADNc de ce polypeptide a été cloné et séquencé simultanément par deux groupes de chercheurs (Chan et al., 1991; Itoh et al., 1991). Ils ont repéré dans la séquence de 475 acides aminés une structure en doigt de zinc et un motif de type "leucine zipper" qui intervient dans la dimérisation des protéines. Compte tenu qu'aucune interaction entre la protéine Ro 52 kD et les ARN Ro n'a été démontrée, cette protéine serait un constituant de la RNP Ro par le biais d'une liaison avec la protéine Ro 60 kD (Slobbe et al., 1992).

Il a été suggéré que la RNP Ro soit formée par l'association d'au moins une des trois protéines Ro à un seul ARN Ro (Wolin et Steitz, 1984; Yagamata et al., 1984; Boire et Craft, 1990). En admettant que la protéine Ro 52 kD ne lie pas directement l'ARN et que la protéine La ne se retrouve pas associée aux ARN en absence de la protéine Ro 60 kD (Mamula et al., 1989b), il n'y a que la protéine Ro 60 kD qui pourrait constituer à elle seule une RNP Ro avec l'ARN.

La fonction biologique de la RNP Ro n'est pas encore élucidée et sa localisation intracellulaire demeure une controverse. Tout d'abord détectée dans le cytoplasme (Clark, et al., 1969; Hendrick et al., 1981), elle a été par la suite assignée au noyau (Alspaugh et al., 1976; Harmon et al., 1984; Ben-Chetrit et al., 1988). Les particules Ro sont peu abondantes dans la cellule (5×10^5 copies par cellule) (Hendrick et al., 1981) et se retrouvent dans une variété de tissus humains (Harmon et al., 1984). Cependant, la RNP Ro est exprimée différemment dans les cellules anuclées. Dans les érythrocytes, seuls les ARN hY1 et hY4 sont détectés

en présence des protéines Ro 60 kD et 54 kD qui se distinguent antigéniquement des protéines Ro de cellules HeLa (Rader et al., 1989; Itoh et al., 1990). Dans les plaquettes sanguines, la RNP Ro est 20 à 30 fois moins abondante que dans les lymphocytes. De plus, une protéine Ro de 52 kD antigéniquement différente de celle des lymphocytes est présente majoritairement dans les plaquettes; on y retrouve seulement les ARN hY3 et hY4 (Itoh et Reichlin, 1991). Le nombre des ARN Ro varie de 1 à 4 selon les espèces analysées (Wolin et Steitz, 1984; Harmond et al., 1984; Mamula et al., 1989a) et jusqu'à maintenant, chacune de ces espèces possède un ARN qui co-migre avec l'ARN hY1 (Mamula et al., 1989a).

1.4 ANTIGÉNICITÉ DE LA RNP Ro

Les sérums autoimmuns sont généralement polyclonaux et des épitopes multiples sont reconnus sur un même autoantigène (Tan, 1989). Bien que les anticorps anti-Ro soient fréquemment les seuls autoanticorps d'un sérum, les anticorps anti-La sont eux, par contre, presque toujours retrouvés en présence des anti-Ro (Hardin, 1986; Reichlin, 1986). La particule Ro porte à la fois les déterminants antigéniques du La et du Ro et ceci explique la coexistence de ces anticorps dans un même sérum (Hendrick et al., 1981; Mamula et al., 1989b). Les différentes protéines Ro (60 kD, 52/54 kD et La) se distinguent antigéniquement et les autoanticorps anti-Ro reconnaissent des épitopes linéaires ou conformationnels. Cependant, il a été démontré que certains sérums anti-Ro reconnaissent des épitopes conformationnels uniquement et que ce type d'épitope serait immunodominant (Boire et al., 1991). S'ajoute enfin à ces observations le fait qu'un déterminant antigénique conformationnel a été identifié à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre la RNP Ro^{hY5} (Boire et Craft, 1989).

1.5 LES AUTOANTICORPS ANTI-ARN

Les anticorps dirigés contre les acides nucléiques sont fréquemment détectés chez les personnes atteintes de LED. Les autoanticorps anti-ADN ont été plus particulièrement étudiés et certains leur attribuent un rôle pathogénique dans cette maladie (Koffler et al., 1974). Les premières études portant sur les autoanticorps anti-ARN ont démontré que la reconnaissance par ces anticorps était essentiellement non spécifique et qu'il ne s'agissait pas d'une réaction croisée avec les anti-ADN. Des anticorps dirigés contre de l'ARN simple brin ou double brin ont été identifiés en utilisant des populations hétérogènes d'ARN cellulaire, viral ou synthétique. Plus récemment, les autoanticorps reconnaissant spécifiquement de l'ARNt (ARN de transfert), de l'ARNr (ARN ribosomal) et les ARN U (ARN nucléaires) ont été mis en évidence. Ces anti-ARN coexistent avec d'autres autoanticorps qui eux reconnaissent les protéines associées aux ARN cibles (Hoet et van Venrooij, 1992).

Plusieurs patients atteints de myosite inflammatoire développent des autoanticorps contre les aminoacyl-ARNt synthétases. Les sérums de spécificité PL-12 contiennent des autoanticorps qui reconnaissent distinctement l'alanyl-ARNt synthétase et l'ARNt correspondant soit, l'ARNt^{Ala} (alanine) (Bunn et al., 1986). Par des essais de liaison à des oligonucléotides et de protection aux ribonucléases, l'épitope reconnu par les anti-ARNt^{Ala} a été délimité à une séquence de 7 à 9 nt comprenant l'anticodon (Bunn et Mathews, 1987). Des autoanticorps spécifiques pour les ARNt initiateurs ont également été rapportés (Wilusz et Keene, 1986) et contrairement à ce qui a été observé dans le cas de l'autoantigène ARNt^{Ala}, la structure secondaire des ARNt initiateurs est requise pour la liaison des anticorps. Un des deux épitopes caractérisés correspond à une

structure fortement conservée puisqu'il est exprimé par le formyl-ARN^{tMet} (Méthionine) initiateur de *E. coli*.

Un déterminant antigénique très conservé a également été décelé avec des anticorps anti-ARNr 28S (Uchiumi et al., 1991). Lorsque l'ARNr 28S est soumis à la ribonucléase T1, une séquence de 59 nt très conservée chez les eucaryotes est protégée par l'anticorps. Cette séquence identique chez l'humain et chez la souris a une homologie de 58% à un fragment de l'ARNr 23S de *E. coli* qui constitue le site de l'activité GTPase de la sous-unité ribosomale 50S. La liaison des facteurs d'élongation EF-1a et EF-2 au ribosome ainsi que l'activité GTPase sont inhibées par les anticorps anti-28S. Par la suite, une autre équipe a identifié 20 sérums de même spécificité et a démontré que la reconnaissance de cet épitope était grandement affectée par des mutations impliquant ou non des changements de conformation (Chu et al., 1991).

L'ARN U1 est également la cible des autoanticorps (Wiluz et Keene, 1986; van Venrooij et al., 1990). L'équipe de van Venrooij (1990) a récemment identifié 45 sérums anti-ARN U1 en analysant 118 sérums anti-snRNP ("small nuclear RNP"). Selon cette étude, aucun autre ARN U n'est antigénique et les anticorps anti-ARN U1 sont présents dans les sérums de spécificité anti-RNP U1. Deux boucles de l'ARN U1 (boucles II et IV) représentent les régions principalement reconnues par les anticorps et ces épitopes seraient conformationnels (Deutscher et Keene, 1988; Hoet et al., 1992b).

Plus récemment, un autre type d'autoanticorps dirigé contre les ARN U a été rapporté par Okano et Medsger (1992). Ces anticorps reconnaissent un "cap" formé par un résidu 2,2,7-méthylguanilate présent à l'extrémité 5'

de tous les ARN U à l'exception de l'ARN U6. Cette équipe a identifié cette nouvelle spécificité antigénique par des essais de compétition en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre cette même structure ainsi qu'un analogue du cap (le cap 7-méthylguanilate) à titre de compétiteur.

Les facteurs qui génèrent les anticorps anti-ARN ne sont pas encore connus et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer leur production: l'activation polyclonale des lymphocytes B, l'immunisation par l'antigène, le mimétisme moléculaire et les anti-idiotypes. Le mode de production anti-idiotypique semble le plus probable puisque ces anticorps coexistent avec des anticorps dirigés contre les protéines associées aux ARN. Toutefois, la plupart des évidences recueillies jusqu'à maintenant tendent à écarter cette hypothèse et à favoriser plutôt le mécanisme d'immunisation directe par l'antigène. Ceci est dû au fait qu'aucune protéine connue ne lie la boucle IV de l'ARN U1, un des deux déterminants antigéniques identifiés et que la protéine P, ciblée par des anticorps présents dans les mêmes sérums que ceux contenant des anti-ARN 28 S, ne lierait pas directement cet ARN (Hoet et van Venrooij, 1992; Chu et al., 1991).

1.6 PERTINENCE DE LA RECHERCHE

De nombreuses découvertes témoignent de l'importante contribution des autoanticorps en recherche clinique et fondamentale. Ils ont permis l'identification et le clonage de plusieurs constituants de la cellule et ils ont aidé à définir certains processus cellulaires notamment celui de l'épissage des ARN messagers (Tan, 1989; Saitta et Keene, 1992). Il semble que les anticorps anti-ARN spécifiques puissent également fournir de nouvelles informations concernant l'activité d'un ARN ou son

association à d'autres molécules. À titre d'exemple, Bunn et Mathews (1987) ont identifié les anticorps anti-ARNt^{Ala} (alanine) qui reconnaissent un épitope correspondant à l'anticodon de cet ARNt et à quelques nucléotides voisins. En utilisant les anticorps anti-28S, Uchiumi et ses collaborateurs ont confirmé l'identité d'une séquence biologiquement active sur le ribosome car ces anticorps inhibaient certaines fonctions du complexe et que la séquence antigénique était très homologue à la séquence de l'ARN 23S de *E. coli* qui constitue le centre GTPase (Uchiumi et al., 1991).

Malgré le fait qu'ils soient rarement pathogéniques, les autoanticorps ont grandement aidé à établir de bons critères diagnostiques en étant des marqueurs de la maladie. La caractérisation de la réponse antigénique peut donc servir à mieux définir les maladies autoimmunes. Il a été démontré avec les anticorps anti-ARN U1 que le titre de ces anticorps fluctuait avec l'activité de la maladie (Hoet et al., 1992a). Si une telle corrélation existe avec d'autres anti-ARN, les anti-ARN hY5 pourraient éventuellement être utilisés pour poser un pronostic et suivre l'évolution de la maladie.

Les anti-ARN sont difficiles à produire par immunisation d'animaux (Stollar, 1980) et leur présence dans les maladies autoimmunes pourrait refléter un défaut majeur des mécanismes immunologiques de la tolérance. Les anticorps anti-ARN représentent donc une source appréciable d'informations concernant les mécanismes de production des autoanticorps. De même, les anticorps anti-ARN hY5 qui constituent une autre forme antigénique des anticorps anti-Ro pourraient également contribuer à mieux définir l'immunogénicité de la particule Ro.

1.7 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le but de cette recherche était de caractériser la nouvelle spécificité antigénique que représentent les autoanticorps anti-ARN hY5. Nous avons poursuivi les objectifs suivants:

- a) cloner l'ADNc de l'ARN hY5 et produire divers mutants de cet ARN;
- b) identifier d'autres sérums ayant la même spécificité anti-ARN hY5 et évaluer la fréquence avec laquelle ces anticorps sont produits;
- c) définir le ou les épitopes que ces autoanticorps reconnaissent sur l'ARN hY5.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CARACTÉRISATION DES SÉRUMS

Les sérums que nous avons utilisés dans cette étude ont été caractérisés par immunoprécipitation et proviennent de la banque de sérums de l'Unité des maladies rhumatismales du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (C.H.U.S.). Ils ont été prélevés chez des donneurs sains et chez des patients souffrant de LED ou de polyarthrite rhumatoïde. Les critères utilisés pour diagnostiquer ces deux maladies sont ceux définis par l'American College of Rheumatology.

2.2 CULTURE DE CELLULES ET MARQUAGE AU ^{32}P ORTHOPHOSPHATE

Les cellules humaines HeLa proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD). Elles sont maintenues en culture à 37°C en présence de CO₂(5%) dans le milieu RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) auquel sont ajoutés du sérum de veau foetal (10%) décomplémenté (56°C, 30 min.), de la pénicilline G (60 µg/ml) ainsi que de la streptomycine (100 µg/ml). Si un marquage des ARN est requis, les cellules sont alors cultivées pendant 14 heures dans un milieu RPMI 1640 sans phosphate contenant 10 µCi/ml de [^{32}P]-orthophosphate (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

2.3 PRÉPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES

Les cellules sont centrifugées 10 min. à 300 g, lavées 2 fois avec un tampon TBS (10 mM Tris-Cl [pH 7.5], 150 mM NaCl) et resuspendues dans un tampon NET-2 (50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-

40) contenant 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) et 10 U de RNasin (Promega, Madison, WI). Par la suite, les cellules sont lysées par sonication sur glace (4 fois 20 sec., à l'aide d'un appareil Sonic Dismembrator 300, Fisher Scientific). La suspension obtenue est clarifiée par une centrifugation de 20 min. à 13,000 g et le surnageant recueilli est utilisé directement comme source d'antigène.

2.4 IMMUNOPRÉCIPITATION

L'immunoprécipitation débute par la liaison des anticorps à la protéine A liée à des billes de sepharose C4LB (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ). Dix μ l de sérum sont incubés pendant 2 heures à 4°C avec 3 mg de billes de protéine A-Sepharose dans 500 μ l de tampon IPP (10 mM Tris-Cl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40). Les billes subissent 4 lavages avec le tampon IPP, 2 lavages avec le tampon NET-2 et sont finalement resuspendues dans 400 μ l de tampon NET-2. L'antigène est alors ajouté aux billes et incubé pendant 60 min. à 4°C. Lorsque la source d'antigène est exclusivement constituée d'ARN, la solution d'incubation contient en plus: 1 mg/ml d'héparine, 50 μ g/ml d'ARNt (ARN de transfert), 2 mM de DTT (dithiothréitol) et 40 U/ml de RNasin. L'incubation est suivie de 6 lavages avec le tampon NET-2. Les billes sont resuspendues dans ce même tampon auquel sont ajoutés 0.85% de SDS, 300 mM d'acétate de sodium et 25 μ g d'ARNt. Les ARN sont extraits au PCA (phénol: chloroforme: alcool isoamylique; 50:50:1 contenant 0.1% 8-hydroxyquinoline), précipités avec 2.5 volumes d'éthanol 100% (1 heure à -80°C), lavés à l'éthanol 70% et séchés sous vide. Le culot obtenu est dissous dans le tampon NET-2 pour les analyses subséquentes.

2.5 ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'URÉE-POLYACRYLAMIDE

Le fractionnement de l'ARN s'effectue en gel dénaturant composé d'urée (7 M), de polyacrylamide (acrylamide: N,N méthylène-bis-acrylamide; 29:1) et de tampon TBE (90 mM Tris, 2.5 mM EDTA et 89 mM acide borique). Pour provoquer la polymérisation, 5 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 0.5 µl de TEMED sont ajoutés à chaque ml de solution. Avant de placer l'échantillon sur le gel, 1 volume de colorant à la formamide (10 mM EDTA, 1 mg/ml xylène cyanol, 1 mg/ml bleu de bromophénol dans du formamide déionisé) est mélangé à la solution d'ARN et le tout est incubé pendant 90 sec. à 100°C. La concentration en polyacrylamide et les dimensions des gels varient selon les exigences.

2.6 CLONAGE DE L'ADNc DE L'ARN hY5

Nous avons cloné l'ADNc de l'ARN hY5 à partir d'un échantillon d'ARN Ro purifié par immunoprécipitation. Tous les clones ont été insérés dans les plasmides de façon directionnelle; chaque amorce utilisée avait à l'extrémité 5' la séquence du site de restriction de l'enzyme Xba I ou Hind III. Les oligonucléotides ont été synthétisés dans le laboratoire du Dr. Pierre Bourgaux au C.H.U.S.

2.6.1 Production de l'ADNc correspondant à l'ARN hY5

La synthèse du premier et du deuxième brins a été effectuée tel que suggéré par Sambrook et ses collaborateurs (Sambrook et al., 1989). Un culot d'environ 0.8 µg d'ARN Ro constitué à 30% d'ARN hY5 a été utilisé avec l'amorce suivante: 5'-TTAAGCTTAAAACAGCAAGCTAGTCAAGCG-3'. Cet oligonucléotide correspond à la séquence complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARN hY5. La transcriptase inverse AMV (Avian

Myeloblastosis Virus, Pharmacia) est ajoutée à l'échantillon qui est incubé pendant 2 heures à 42°C. À l'étape suivante, qui consiste à produire le second brin, sont ajoutés les réactifs de la deuxième réaction, l'ADN-polymérase Taq (Promega) et la deuxième amorce: 5'-AATCTAGAGTTGGTCCGAGTG-3'. Celle-ci correspond à la séquence complémentaire de l'extrémité 5' du premier brin de l'ADNc. L'échantillon est incubé tout d'abord à 55°C pendant 30 min. et ensuite à 74°C pendant 30 min. Les produits de synthèse sont détectés grâce à des réactions menées en parallèle où un marqueur [α -³²P]-dCTP est utilisé.

2.6.2 Production d'ADN recombinant

L'échantillon d'ADNc produit est purifié par une extraction au PCA, précipité à l'éthanol, puis digéré avec les enzymes Xba I et Hind III. Les conditions enzymatiques sont celles prescrites par les manufacturiers (Pharmacia et Promega). Purifié et précipité à nouveau, l'ADN est finalement lié au plasmide pGEM-3Zf(+) (Promega) préalablement coupé par les deux mêmes enzymes et purifié par chromatographie d'affinité (méthode "GeneClean" de BIO 101 Inc., La Jolla, CA). La réaction de ligation se produit à la température ambiante pendant 16 heures avec l'ADN-ligase T4 dans le tampon suggéré par le fournisseur (Pharmacia). Le plasmide obtenu, soit le pY5-125 décrit à la Figure 2 est transformé dans la souche *E. coli* JM109 (Yanish-Perron et al., 1985) et produit en mini-préparation de plasmides par la méthode de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989).

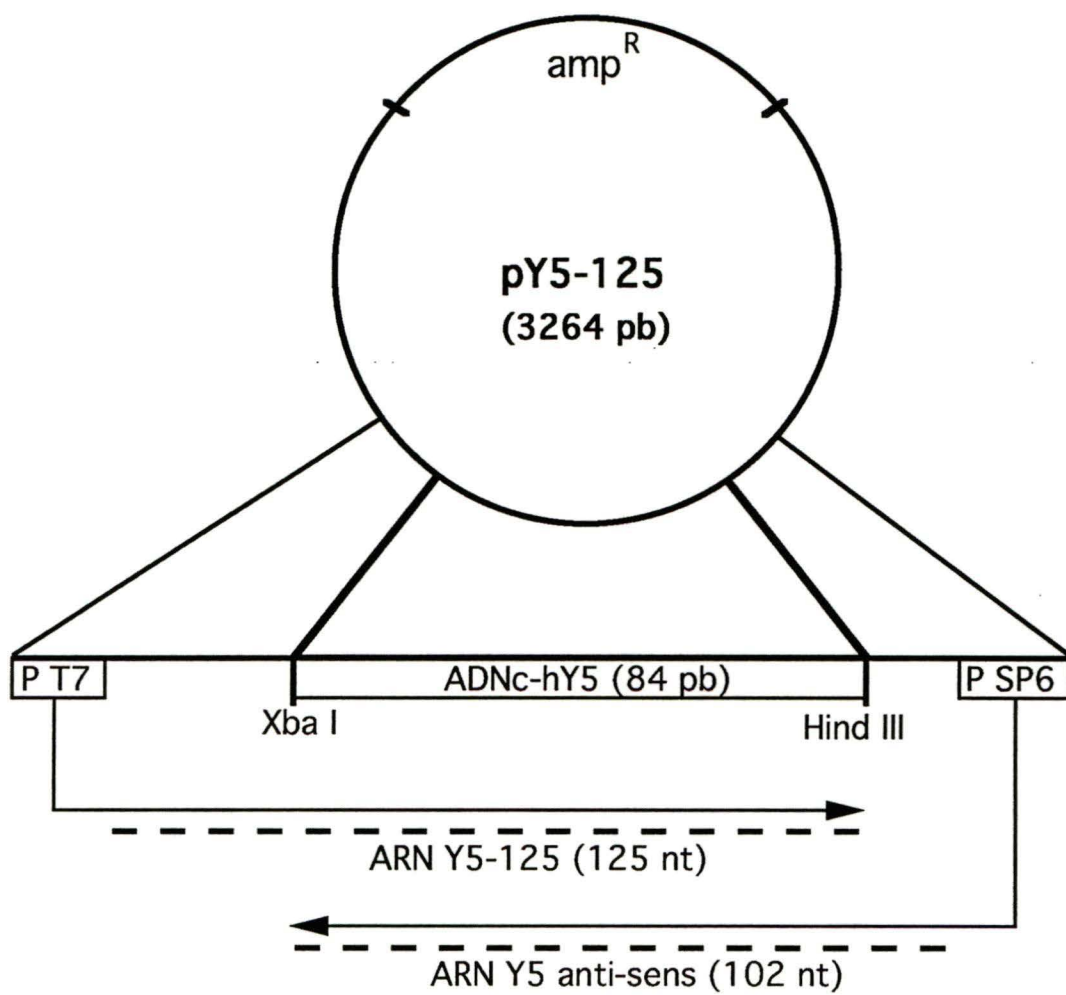
2.6.3 Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est effectué selon la technique décrite par Sanger (Sanger et al., 1977). Le "T7 Sequencing™ Kit" (Pharmacia) est utilisé

Figure 2. Schéma de pY5-125 et des ARN produits par ce plasmide

Une séquence de 84 pb correspondant à l'ADNc de l'ARN hY5 a été insérée dans le plasmide pGEM-3Zf(+) aux sites d'enzymes de restriction Xba I et Hind III. pY5-125 est un plasmide de 3264 pb.

- amp^R**: gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline
- P T7**: séquence promotrice reconnue par l'ARN-polymérase T7
- P SP6**: séquence promotrice reconnue par l'ARN-polymérase SP6
- ▶**: séquence d'ADN transcrite par l'ARN-polymérase après linéarisation du plasmide
- - -**: ARN produit



avec 10 mCi/ml de [α - ^{32}P]-dCTP ou 10 mCi/ml de [α - ^{35}S]-dCTP (Amersham). Les échantillons sont fractionnés en gel d'urée-polyacrylamide de 10% sur un appareil de Bio-Rad selon les directives de ce fabricant. Le gel contenant des échantillons marqués au ^{35}S est immergé pendant 20 min. dans une solution contenant 10% acide acétique et 10% méthanol puis séché pendant 1 heure sous vide à 80°C avant d'être soumis à l'autoradiographie.

2.7 SOUS-CLONAGE DE L'ADNc

Pour construire les plasmides pY5-84 et pY5-80, l'ADN correspondant à l'ARN hY5 a été sous-cloné par PCR, puis traité tel que décrit aux sections 2.6.2 et 2.6.3 mais cette fois il a été inséré dans le vecteur pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985). Les plasmides pY5-84 et pY5-80 sont représentés à la Figure 3.

2.7.1 Production du pY5-84

Le plasmide pY5-84 a été produit à partir de l'ADN plasmidique de pY5-125 et de deux amorces. La première, "A" (5'-AATCTAGATAATACGACTCACTATAAGTTGGTCCGA-3') renferme la séquence promotrice de l'ARN-polymérase T7 suivie de celle de l'ADNc (extrémité 5'). La deuxième, "B" (5'-TTAAGCTTTAAAACAGCAAG-3') correspond à la séquence terminale de l'ADNc qui forme, avec les nucléotides suivants, le site de coupure de l'enzyme Dra I. La réaction d'amplification est composée de 10 μl de tampon PCR (100 mM Tris-Cl [pH 9.0], 15 mM MgCl_2 , 500 mM KCl), 4 μl 100 mM DTT, 2.5 μl 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μl 3 mg/ml BSA, 1 μl de chaque oligonucléotide (15 pmoles/ μl) dans un volume final de 100 μl . Le plasmide pY5-125 (0.1 μg) et 1 μl d'ADN-polymérase Taq sont finalement ajoutés. Nous avons utilisé les

Figure 3 A. Schéma de pY5-84 et des ARN produits par ce plasmide

Une séquence de 108 pb correspondant à l'ADNc de l'ARN hY5 et au promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7 a été insérée dans le plasmide pUC19 aux sites d'enzymes de restriction Xba I et Hind III.

amp^R: gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

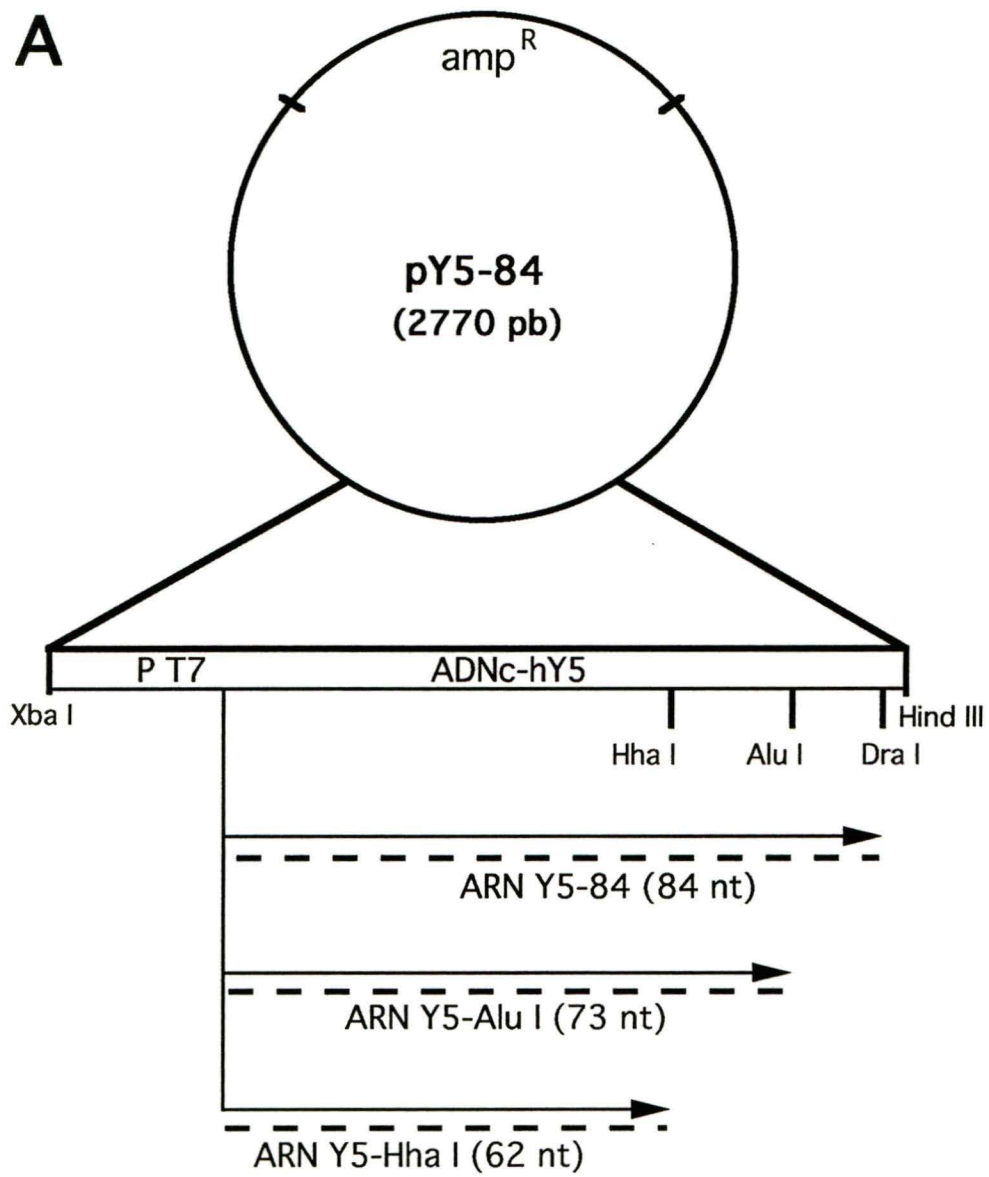
P T7: séquence promotrice reconnue par l'ARN-polymérase T7

—►: séquence d'ADN transcrite par l'ARN-polymérase après linéarisation du plasmide

- - -: ARN produit

Figure 3 B. Le plasmide pY5-80

La structure de pY5-80 ne diffère de celle de pY5-84 que par une délétion de 4 nucléotides dans la séquence codante de l'ADNc de l'ARN hY5 (position 58-61).



B

pY5-80 (2766 pb):

ARN Y5-80 (80 nt)

ARN Y5(80)-Alu I (69 nt)

ARN Y5(80)-Hha I (58 nt)

cycles d'amplification d'un programme "Touchdown" (Don et al., 1991) modifié et décrit à l'annexe 1.

2.7.2 Production du pY5-80

La production du mutant de délétion pY5-80 a été réalisée à partir de pY5-84 avec la technique de mutagenèse par PCR (Ho et al., 1989). Deux oligonucléotides ont été synthétisés: "C" (5'-AGTCAAGCGCGTGGGGGAG-3') et "D" (5'-CTCCCCCAGCGCTTGACT-3'). En utilisant ces amorces, une délétion de 4 nucléotides (position 58-61) est générée à la première étape d'amplification d'ADN. Deux réactions de PCR sont préparées en parallèle. Un tube contient les oligonucléotides "A" (flanquant homologue) et "C" (mutant complémentaire), l'autre tube contient les oligonucléotides "B" (flanquant complémentaire) et "D" (mutant homologue). Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles décrites à la section 2.6.1. À l'étape qui suit, les deux échantillons sont combinés (1/10 du volume total de chacun) et l'ADN nouvellement synthétisé sert de brin-mère pour une seconde amplification. Pour cette deuxième réaction, les amorces "A" et "B" sont ajoutées avec tous les réactifs de départ.

2.8 SYNTHÈSE *IN VITRO* ET PURIFICATION DES ARN

La préparation de l'ADN à transcrire, la réaction de synthèse et la purification sur gel, sont réalisées selon les protocoles décrits par Chabot (Chabot, sous presse), avec modifications mineures. Avant la transcription, les plasmides purifiés sur gradient de chlorure de césium sont linéarisés avec une enzyme de restriction et extraits au PCA (voir les enzymes de restriction utilisées versus les transcrits produits aux Figures 2 et 3). Les extensions 3' produites par l'enzyme de restriction

Hha I sont converties en bouts francs par l'activité exonucléasique du fragment Klenow de l'ADN-polymérase I de *E. coli*. La réaction de synthèse se fait en présence de 4 µl de tampon de transcription (200 mM Tris-Cl [pH 7.5], 30 mM MgCl₂, 10 mM spermidine, 25 mM NaCl, 50 mM DTT), 1 µl 1mg/ml BSA, 0.8 µl RNasin, 4.0 µl rNTP (10 mM ATP, CTP, GTP et 1 mM UTP), 1 µg d'ADN, 5 µl 20 mCi/ml [α -³²P]-UTP, 1 µl d'ARN-polymérase T7 ou SP6 pour un volume final de 20 µl. Lorsque l'expérimentation le permet, les plasmides pY5-84 et pY5-80 sont transcrits en présence de [α -³²P]-CTP puisqu'une concentration limitante en CTP donne de meilleurs rendements qu'une concentration limitante en UTP. L'échantillon est incubé à 37°C pendant 2 heures et 1 µl 10 mg/ml de DNase I est ajouté au cours des dernières 15 min. d'incubation. Un volume égal de colorant à la formamide est ensuite ajouté, l'échantillon est bouilli 90 sec. et placé sur un gel dénaturant. Après l'électrophorèse sur gel d'urée-polyacrylamide, le gel est exposé sur un film Kodak XAR-5 (environ 30 sec.). La bande d'ARN repérée sur l'autoradiogramme est excisée du gel, réduite en pièces à l'aide d'une tige de verre induite de silicone et éluée avec 400 µl d'une solution de 0.3 M acétate de sodium et 0.2% SDS, en agitant pendant 3 heures à la température ambiante. L'ARN est ensuite purifié du surnageant par extraction au PCA en présence de 30 µg d'ARNt et finalement précipité à l'éthanol.

2.9 DIGESTION À LA RIBONUCLÉASE T1

L'ARN Y5-84 transcrit *in vitro* en présence de [α -³²P]-UTP est digéré avec la RNase T1 (Calbiochem, La Jolla, CA) pendant 20 min. dans un tampon d'enzyme de restriction OPA+ (Pharmacia) de 1X. Pour une digestion partielle, la réaction se produit sur glace en présence de 0.05 U/µl de RNase T1 et pour une digestion presque complète, l'échantillon est incubé

à 30°C avec 0.25 U/ μ l de RNase T1. Les fragments d'ARN sont dénaturés à 100°C pendant 2 min. et refroidis sur glace ou ajoutés directement à la réaction d'immunoprécipitation. Les fragments reconnus par les anticorps anti-ARN hY5 sont purifiés sur gel d'urée-polyacrylamide de 18% (voir section 2.8) et identifiés par digestion complète. Les fragments d'ARN sont alors resuspendus dans une solution contenant 2 U/ μ l de RNase T1 et incubé pendant 30 min. à 30°C. Les produits de cette digestion sont fractionnés sur gel d'urée-polyacrylamide de 20% et révélés par autoradiographie.

2.10 GEL DE RÉTENTION

Dans le but de détecter la formation de complexes antigène-anticorps, 2 μ l de sérum sont mélangés à 10 μ l d'une solution de NET-2 contenant 2 mM MgCl₂, 1% polyvinylalcool, 0.25 mg/ml d'ARNt, 5 mM DTT, 0.3 μ l de RNasin et l'ARN marqué au ³²P. Après une incubation de 15 min. sur glace, 3 μ l 1 mg/ml d'héparine et 3 μ l de colorant au glycérol (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol et 30% glycérol) sont ajoutés à l'échantillon. L'électrophorèse se fait en conditions non dénaturantes. Le gel est composé de 4% de polyacrylamide (acrylamide: N,N méthylène-bis-acrylamide; 80:1) et d'un tampon 50 mM Tris-50 mM glycine à pH 8.8. À chaque ml de solution sont ajoutés 10 μ l de persulfate d'ammonium à 10% et 0.6 μ l de TEMED. Une pré-électrophorèse de 30 min. à 190 volts précède le dépôt des échantillons. La migration se fait au même voltage. L'ARN libre ou retardé par les anticorps est ensuite révélé par autoradiographie (Chabot et al., 1992).

2.11 PRÉDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN

Pour prédire la structure secondaire adoptée par une molécule d'ARN, nous avons soumis sa séquence au programme informatisé FOLD (Zuker et Stiegler, 1981) du Genetic Computer Group (GCG) de l'Université du Wisconsin USA (Devereux et al., 1984).

3. RÉSULTATS

Dans cette partie, nous décrivons un nouveau type d'autoanticorps anti-Ro qui reconnaît spécifiquement la composante ARN de la RNP Ro^{hY5}. Nous présentons plus particulièrement les résultats obtenus quant à la définition de l'épitope reconnu par ces anticorps.

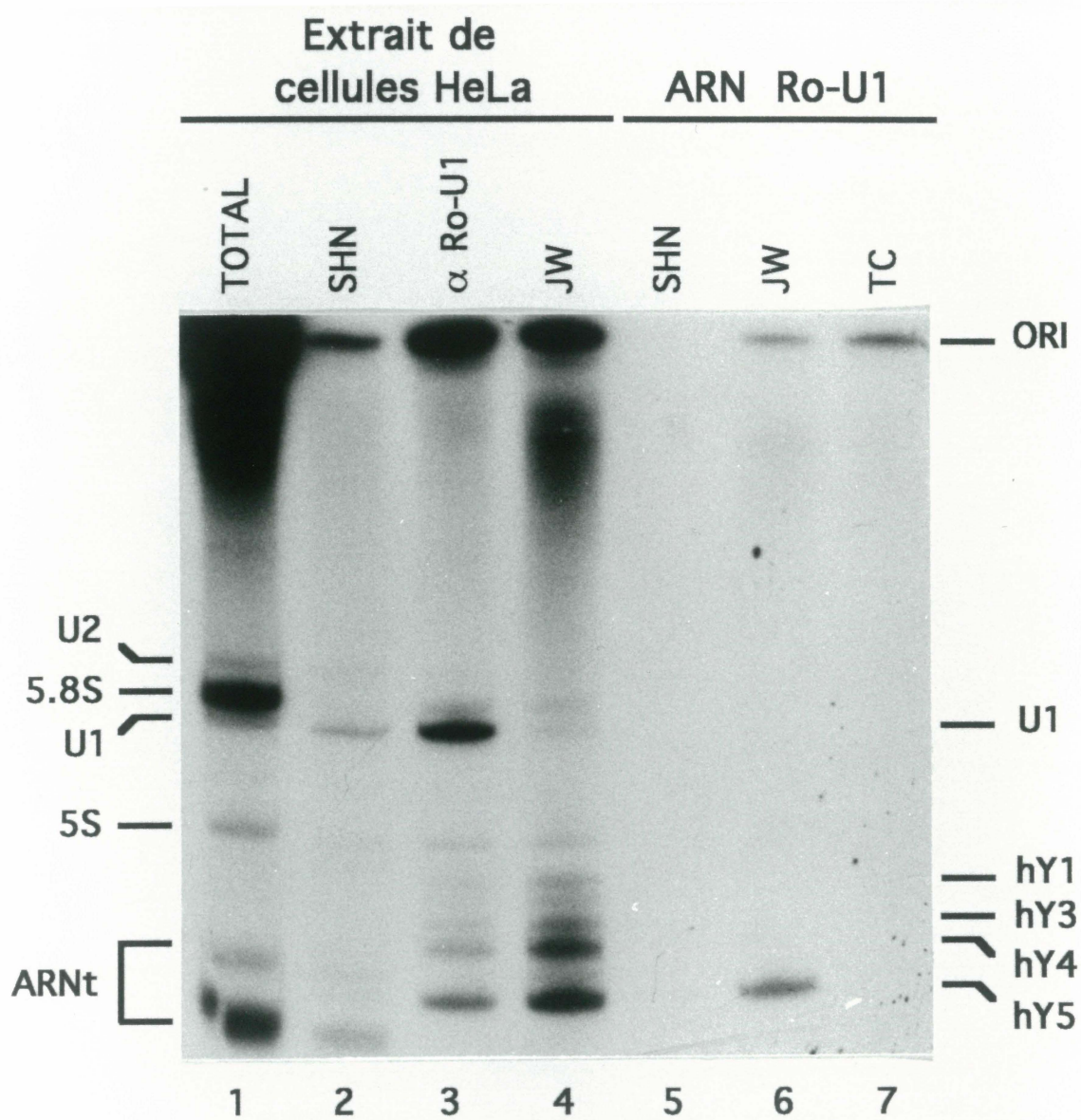
3.1 RECONNAISSANCE SPÉCIFIQUE DE L'ARN hY5 PAR DES AUTOANTICORPS

La première évidence de cette nouvelle spécificité antigénique nous est démontrée par l'immunoprécipitation sélective de l'ARN hY5 (Figure 4). À partir d'un extrait cellulaire marqué au ³²P, les RNP Ro sont immunoprécipitées par des autoanticorps anti-Ro. La composante ARN des RNP est extraite par un traitement au PCA et fractionnée en gel dénaturant. La présence des ARN se détecte ensuite par autoradiographie. Les deux sérums anti-Ro (lignes 3 et 4) immunoprécipitent les RNP Ro (hY1-5). Ce même échantillon, enrichi en ARN Ro et déprotéinisé, sert de source antigénique à une deuxième immunoprécipitation. Celle-ci permet d'identifier les anticorps anti-ARN Ro. Nous constatons que le sérum JW contient des anticorps qui reconnaissent spécifiquement l'ARN hY5 (ligne 6), tandis que les deux sérums, normal et TC (anti-Ro), n'en contiennent pas (lignes 5 et 7). Puisqu'aucun anticorps anti-ARN Ro n'a été rapporté jusqu'à maintenant, le sérum JW, prélevé chez une personne atteinte de LED, constitue le premier exemple de cette spécificité. Les autoanticorps du sérum JW reconnaissent à la fois les protéines Ro et l'ARN hY5. Les Ig (immunoglobulines) qui reconnaissent l'ARN hY5 sont de classe G, puisque la protéine A qui sert à l'immunoprécipitation se lie principalement à la partie Fc des IgG.

Figure 4. Immunoprécipitation des RNP Ro et de l'ARN hY5

Lignes 1 à 4: à partir d'extrait de cellules HeLa marquées au ^{32}P , les RNP Ro sont immunoprécipitées et l'ARN est extrait au PCA. Lignes 5 à 7: des ARN Ro-U1 immunoprécipités à l'aide d'un sérum anti-Ro et anti-RNP U1 sont déprotéinisés et servent de source antigénique à l'immunoprécipitation. 1: ARN de l'extrait cellulaire. 2 et 5: un sérum humain normal (SHN). 3: un sérum anti-Ro et anti-RNP U1. 4 et 6: le sérum anti-Ro du patient JW qui reconnaît également l'ARN hY5 (ligne 6). 7: un sérum anti-Ro ne contenant pas d'anti-ARN hY5. L'ARN est fractionné sur un gel d'urée-polyacrylamide de 10%.

ORI: origine de migration



3.2 COMPARAISON DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN Ro

Le fait que parmi tous les ARN Ro (hY1, hY3, hY4 et hY5) seul l'ARN hY5 soit immunoprécipité nous a amenés, dans un premier temps, à supposer qu'une structure propre à cet ARN puisse former l'épitope. Connaissant la séquence de ces ARN, nous avons comparé leur structure secondaire telle que prédite par le programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981). L'appariement des extrémités 5' et 3' constitue la région où l'homologie entre les quatre ARN est la plus forte (Figure 1). Cette région comprend d'ailleurs le site d'attachement de la protéine Ro 60 kD (Wolin et Steitz, 1984). Les quatre ARN ont également une séquence de 3 ou 4 uridines à leur extrémité 3' qui correspond au site de liaison de la protéine La. Nous avons donc écarté ces régions conservées des sites potentiellement reconnus par les anticorps.

3.3 CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT À L'ARN hY5

Afin de poursuivre la caractérisation de ce nouveau type d'autoanticorps, nous avons entrepris la construction d'un vecteur d'expression de l'ARN hY5 en clonant l'ADNc correspondant. Tel que décrit dans la section Matériel et méthodes, nous avons utilisé comme matériel de départ un extrait d'ARN Ro purifié par immunoprécipitation. Nous avons synthétisé l'ADNc de l'ARN hY5 à l'aide de la transcriptase inverse et produit le deuxième brin d'ADN avec l'ADN-polymérase Taq. L'ADNc obtenu a été inséré dans le plasmide pGEM-3Zf(+) et forme le plasmide pY5-125. Comme l'indique la Figure 2, pY5-125 linéarisé au site Hind III et transcrit par l'ARN-polymérase T7 produit un ARN de 125 nt qui correspond à l'ARN hY5 avec des séquences supplémentaires aux extrémités 5' (36 nt) et 3' (5 nt). Ce même plasmide linéarisé au site Xba

l et transcrit par l'ARN-polymérase SP6 produit un ARN de 102 nt dont la séquence correspond à l'anti-sens de l'ARN hY5.

Dans le but de produire *in vitro* un ARN qui serait la réplique exacte de l'ARN hY5, nous avons sous-cloné cet ADNc. La première amorce a été conçue de façon à ce que la transcription débute au premier nucléotide de l'ADNc. Elle contient la séquence promotrice de l'ARN-polymérase T7 juxtaposée à celle de l'ADNc à transcrire. La deuxième amorce ajoute le site de restriction Dra I à l'extrémité 3' de l'ADNc permettant ainsi de linéariser le plasmide au bon endroit. Tel que décrit à la Figure 3, l'ADN obtenu a été inséré dans le vecteur pUC19 et ce nouveau plasmide pY5-84 produit l'ARN Y5-84 qui correspond exactement à l'ARN hY5 (84 nt). La Figure 5 nous montre les résultats du séquençage de l'ADN de pY5-125 et de pY5-84 qui ont confirmé la nature des deux clones.

3.4 L'ARN Y5-125, UN MUTANT DE L'ARN hY5

Les premiers essais d'immunoprécipitation d'ARN synthétisés *in vitro* ont été effectués avec l'ARN Y5-125. Nous avons réalisé que les autoanticorps du sérum JW ne reconnaissaient pas cet ARN. Puisque la non-reconnaissance des anticorps pouvait être attribuable à la présence de séquences supplémentaires à chaque extrémité de l'ARN Y5-125, nous avons vérifié par ordinateur la structure secondaire adoptée par cette molécule. Les résultats de cette prédiction présentés à la Figure 6 nous ont révélé un appariement des extrémités 3' et 5' tout à fait différent de celui observé chez l'ARN hY5. Nous supposons que le pairage des extrémités de l'ADNc à la séquence supplémentaire en 5' abolit l'antigénicité de l'ARN Y5-125 par destruction de l'épitope ou par empêchement stérique.

Figure 5. Séquençage de l'ADN des plasmides pY5-125 et pY5-84

Les lignes 1 à 4 représentent la séquence de l'ADNc de l'ARN hY5 du plasmide pY5-125. Les lignes 5 à 12 représentent la séquence insérée du plasmide pY5-84. Les lignes 5 à 8 se poursuivent avec les lignes 9 à 12 et la partie doublée de la flèche indique la séquence commune entre ces lignes. Les échantillons sont marqués au ^{35}S .

←→ : ADNc de l'ARN hY5

←→ : séquence du promoteur de l'ARN-polymérase
T7

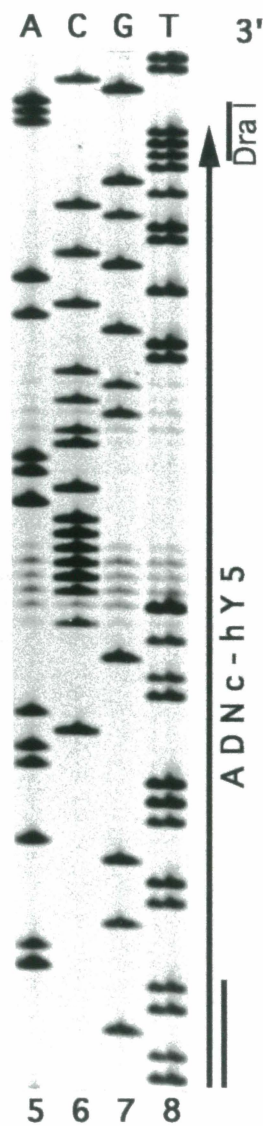
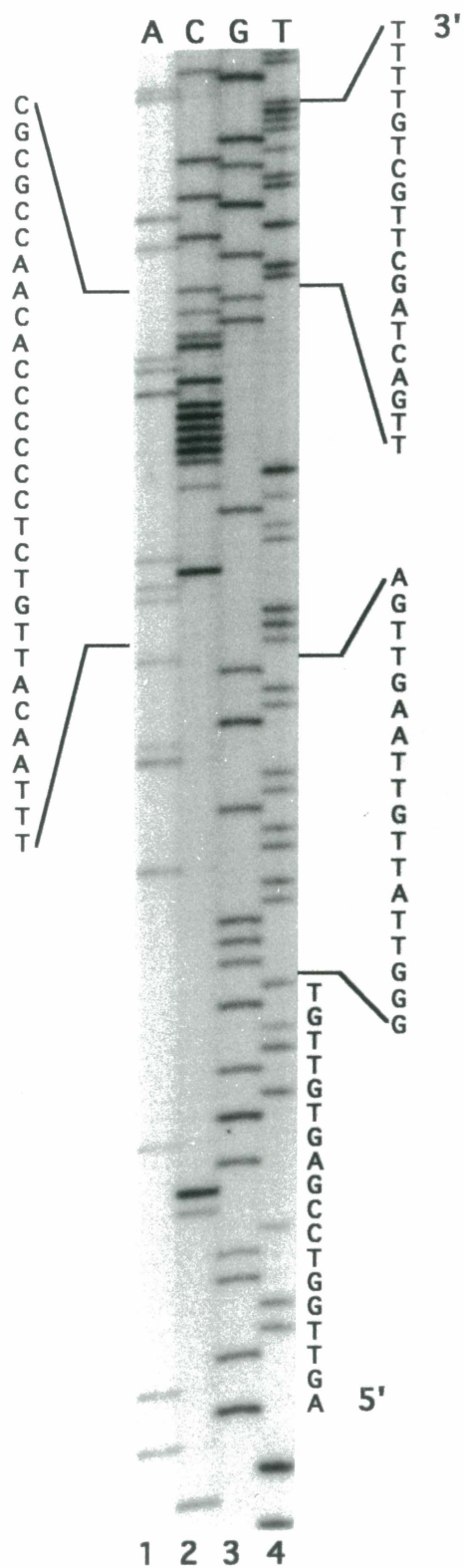
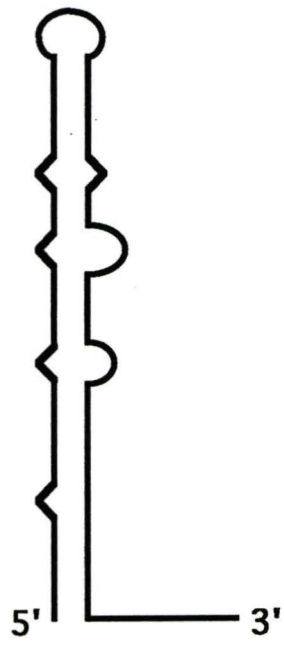


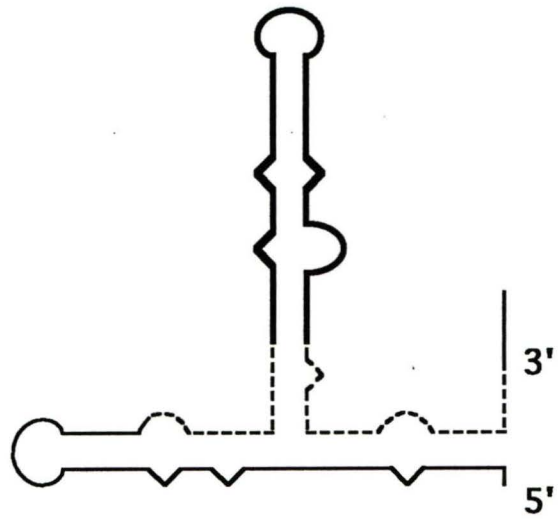
Figure 6. Schéma des structures secondaires prédites des ARN Y5-84 et Y5-125

—— : structure secondaire préservée de l'ARN hY5
---- : structure secondaire modifiée de l'ARN hY5
—— : séquence n'appartenant pas à l'ARN hY5

Y5-84



Y5-125



3.5 RECONNAISSANCE DES ARN SYNTHÉTISÉS *IN VITRO*

Comme nous pouvons le voir à la Figure 7, le sérum JW immunoprécipite spécifiquement l'ARN Y5-84 parmi un mélange d'ARN qui comprend l'ARN Y5-125, l'anti-sens de l'ARN hY5 et l'ARN témoin 3Zf-229 (résultant de la transcription par l'ARN-polymérase SP6 du plasmide pGEM-3Zf(+)) linéarisé avec l'enzyme Bgl I). L'ARN Y5-84 transcrit *in vitro* est donc reconnu spécifiquement par les anticorps anti-ARN hY5. Les ARN Y5-125 et 3Zf-229 (ligne 3) sont quant à eux faiblement immunoprécipités et nous considérons cette reconnaissance comme étant due à des liaisons non spécifiques. Cependant, il est possible que l'ARN Y5-125 adopte plusieurs structures et qu'une de ces structures imitant celle de l'ARN hY5 soit reconnue par les anticorps anti-ARN hY5.

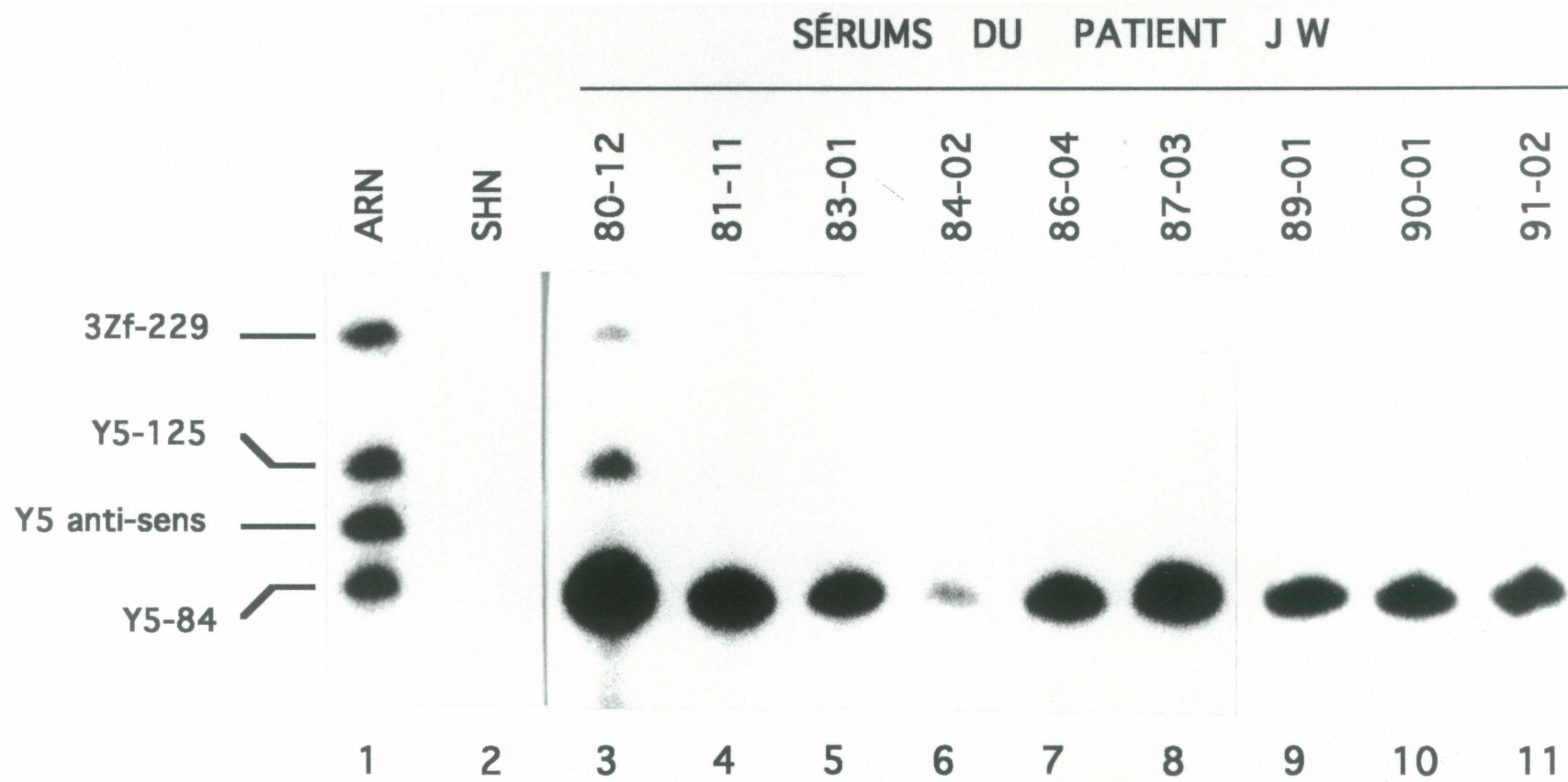
Nous avons analysé 9 prélèvements du sérum JW répartis sur plus de dix ans (Figure 7, lignes 3 à 11). Les anticorps anti-ARN hY5 sont détectés dès le premier prélèvement qui correspond à la période initiale de la maladie. Bien que la technique d'immunoprécipitation telle que nous l'avons utilisée ne soit pas quantitative, la variation de la quantité d'ARN immunoprécipitée demeure une indication que le titre des anticorps anti-ARN hY5 fluctue avec le temps. De façon similaire, des chercheurs (Hoet et al., 1992a) ont récemment rapporté qu'il existe une corrélation entre la variation du titre des anti-ARN U1 et l'activité de la maladie.

3.6 IDENTIFICATION DE SÉRUMS RECONNAISSANT L'ARN hY5

Dans le but d'identifier d'autres sérums contenant des anticorps dirigés contre l'ARN hY5 et d'évaluer la fréquence de cette spécificité, nous avons analysé par immunoprécipitation une cinquantaine de sérums anti-Ro. Sur les 56 sérums analysés, nous avons identifié 5 sérums contenant

Figure 7. Immunoprécipitation spécifique de l'ARN Y5-84 par les sérums du patient JW

Des ARN transcrits *in vitro* ont été utilisés comme source d'antigène: l'ARN Y5-84 (84 nt) qui correspond exactement à l'ARN hY5, l'ARN Y5 anti-sens (102 nt), l'ARN Y5-125 (125 nt) qui correspond à l'ARN hY5 avec des séquences supplémentaires à chaque extrémité et l'ARN 3Zf-229 (229 nt) sans lien avec l'ARN hY5. 1: le mélange des 4 ARN. 2: un sérum témoin (SHN). 3 à 11: des prélèvements du sérum JW qui s'étalent sur une période d'environ 10 ans. L'année et le mois sont indiqués au dessus de chaque piste.



des anticorps anti-ARN hY5. L'immunoprécipitation effectuée avec ces 5 sérums est montrée à la Figure 8 A (lignes 3 à 7). Le Tableau I en résume les résultats. Il indique que 4 des 5 sérums positifs se retrouvent parmi les sérums anti-Ro alors qu'un sérum est anti-Ro-5.8S. En ne tenant compte que des sérums anti-Ro, soit en excluant les sérums U1 et SHN, nous obtenons 5 sérums anti-ARN hY5 sur 52 sérums. Il s'agit donc d'une fréquence d'environ 10%. Il est à noter que certains sérums reconnaissent également l'ARN U1 (MD, SM et EB) et possiblement l'ARN pré-U1 (EB et JB) et que la quantité d'ARN hY5 immunoprécipitée varie d'un sérum à l'autre. Cette variation pourrait représenter le titre des anti-ARN hY5 de chaque sérum ou indiquer l'affinité avec laquelle ces anticorps se lient à l'ARN hY5.

Nous avons ensuite vérifié par immunoprécipitation la spécificité de la reconnaissance de l'ARN hY5 par ces sérums en utilisant des ARN synthétisés *in vitro*. Nous constatons à la Figure 8 B que seuls les sérums MD et JW reconnaissent uniquement l'ARN Y5-84. Les trois autres sérums (SM, EB et JB) démontrent une affinité beaucoup plus grande pour l'ARN Y5-125 que pour l'ARN Y5-84 et nous envisageons deux possibilités pour expliquer ce fait. Premièrement, l'épitope reconnu par ces anticorps se trouve à un site accessible sur l'ARN Y5-125 (aux environs de la boucle supérieure de la molécule) et la structure de l'ARN Y5-125 favorise une liaison à l'anticorps plus stable que la structure de l'ARN Y5-84. Deuxièmement, l'ARN Y5-84 est très faiblement reconnu et par conséquent l'immunoprécipitation d'ARN est principalement due à une reconnaissance non spécifique par les anticorps. Nous avons donc choisi de poursuivre la caractérisation de l'épitope avec les sérums JW et MD et d'étudier plus tard les trois autres sérums.

Figure 8 A. Immunoprécipitation d'ARN cellulaires par les 5 sérums anti-ARN hY5

Nous avons utilisé comme source d'antigène de l'ARN cellulaire marqué au ^{32}P immunopurifié à l'aide d'un sérum anti-Ro et anti-RNP U1 et déprotéinisé par un traitement au PCA. 1: l'ARN utilisé lors de l'immunoprécipitation. 2: le sérum témoin (SHN). 3 à 7: les sérums identifiés anti-ARN hY5. Tous les sérums sont anti-Ro à l'exception de EB qui est un sérum anti-Ro et anti-5.8S (ligne 6). L'ARN U1 est également reconnu (lignes 3, 5 et 6). Une bande située légèrement au-dessus de l'ARN U1 pourrait correspondre à l'ARN pré-U1 (lignes 6 et 7).

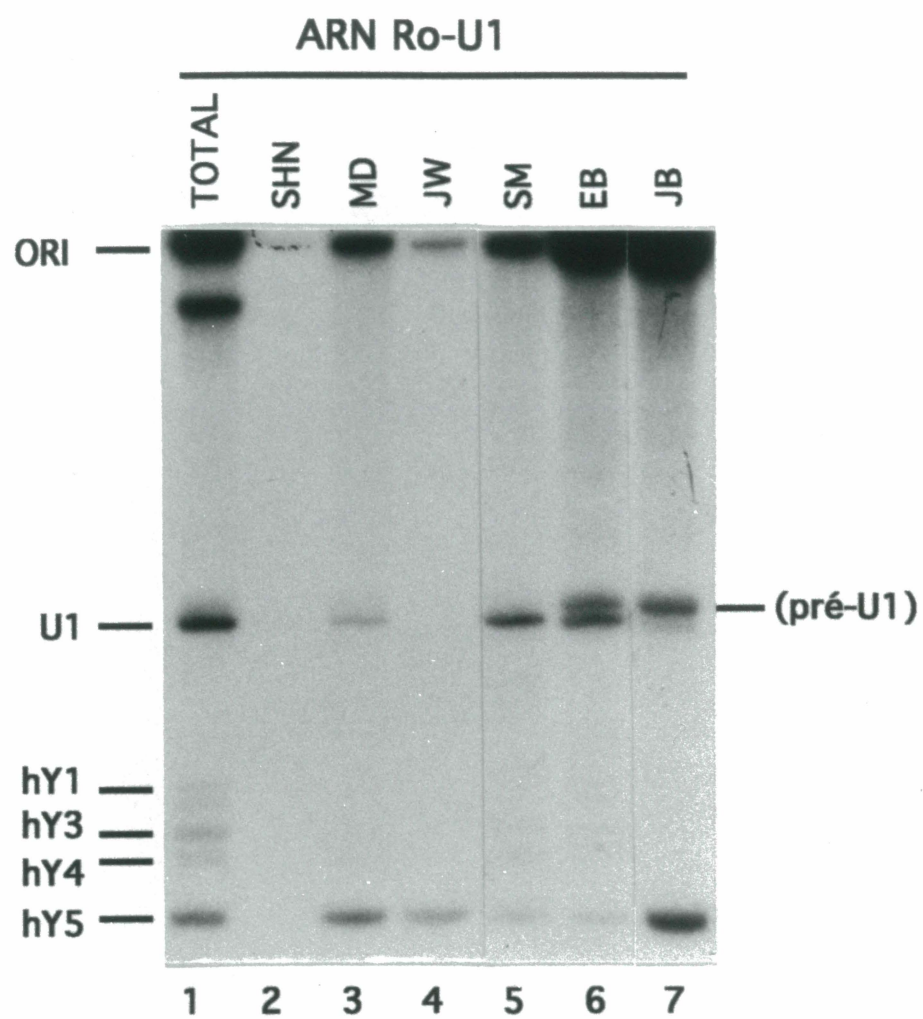
ORI: origine de migration

Figure 8 B. Immunoprécipitation d'ARN produits *in vitro* par les 5 sérums anti-ARN hY5

1: le mélange des 4 ARN utilisés: l'ARN Y5-84 (84 nt), l'ARN Y5 anti-sens (102 nt), l'ARN Y5-125 (125 nt) et l'ARN 3Zf-229 (229 nt). 2 à 7: les sérums décrits à la Figure 8 A, lignes 2 à 7.

Aux Figures 8 A et 8 B, l'ARN est fractionné sur gel d'urée-polyacrylamide de 10%.

A



B

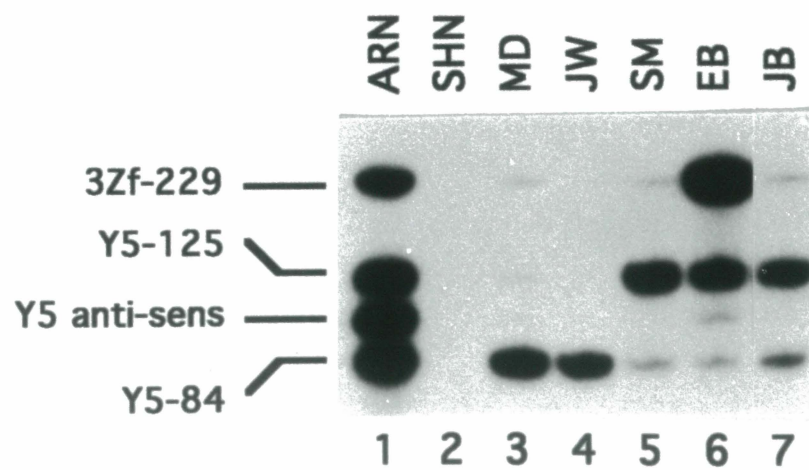


Tableau I: Identification de sérums comportant des autoanticorps anti-ARN hY5

Nombre de sérums analysés	Spécificité des sérums en IP. (anti-RNP)	Nombre de sérums anti-ARN hY5	Nom et # des prélèvements	Autres ARN reconnus
36	Ro	4	JW * MD #8688 EB #8763 JB #6863	(-) U1 U1, pré-U1, n.s. pré-U1, n.s.
11	Ro-La	(-)		
3	Ro-U1	(-)		
1	Ro-5.8S	1	SM #12546	U1
1	Ro-Sm	(-)		
1	U1	(-)		
3	SHN	(-)		
Total: 56	- - -	5		

IP.: immunoprécipitation

(-): négatif

*: plusieurs prélèvements différents ont été analysés

n.s.: reconnaissance non spécifique

3.7 DÉFINITION DE L'ÉPITOPE PAR FRAGMENTATION DE L'ARN hY5

Une des approches que nous avons utilisées pour localiser l'épitope consistait à fragmenter l'ARN et à identifier ensuite les plus courts fragments reconnus par les anti-ARN hY5. Nous avons digéré l'ARN Y5-84 à la RNase T1 et utilisé le sérum JW pour immunoprécipiter les fragments produits (Figure 9). Deux fragments de 31 et 27 nt représentent les plus courts fragments qui sont toujours reconnus par les anticorps (lignes 3 et 6). Parallèlement, les fragments produits ont été dénaturés à la chaleur avant l'immunoprécipitation (lignes 4 et 7). Ce traitement abolit presque complètement la reconnaissance. Ceci démontre que la conformation de la molécule est requise pour la liaison des anticorps à l'épitope. La présence de faibles bandes à la ligne 4 pourrait s'expliquer par le réappariement de certains fragments après la dénaturation à la chaleur.

Pour leur identification, les fragments de 31 et de 27 nt immunoprécipités par les anti-ARN hY5 ont été excisés du gel, purifiés et digérés complètement à la RNase T1. Les résultats de cette analyse apparaissent à la Figure 10. Ils nous révèlent que le fragment de 31 nt est digéré en 4 fragments marqués au ^{32}P : un fragment de 16 nt, un de 5 nt et deux fragments de 4 nt qui forment la séquence située en 3' de l'ARN. Quant au fragment de 27 nt, il correspond à l'extrémité 5' de la molécule puisqu'un fragment de 6 nt et des fragments de 3, de 2 et d'un nt sont détectés. Selon la structure secondaire prédite de l'ARN hY5 schématisée à la Figure 11, le fragment de 31 nt serait en grande partie apparié à celui de 27 nt. L'immunoprécipitation de ces deux fragments appariés est en accord avec l'épitope conformationnel suggéré par l'essai

Figure 9. Immunoprécipitation de fragments de l'ARN Y5-84 obtenus par digestion à la RNase T1

1: l'ARN Y5-84. 2 et 5: l'ARN Y5-84 fragmenté à la RNase T1 et utilisé lors de l'immunoprécipitation. 3 et 6: les fragments intacts reconnus par le sérum JW. 4 et 7: les fragments dénaturés et reconnus par le sérum JW. L'ARN est fractionné sur gel d'urée-polyacrylamide de 18%.

+: digestion partielle (lignes 2 à 4)
+++: digestion presque complète (lignes 5 à 7)
▲ : dénaturation à la chaleur (lignes 4 et 7)

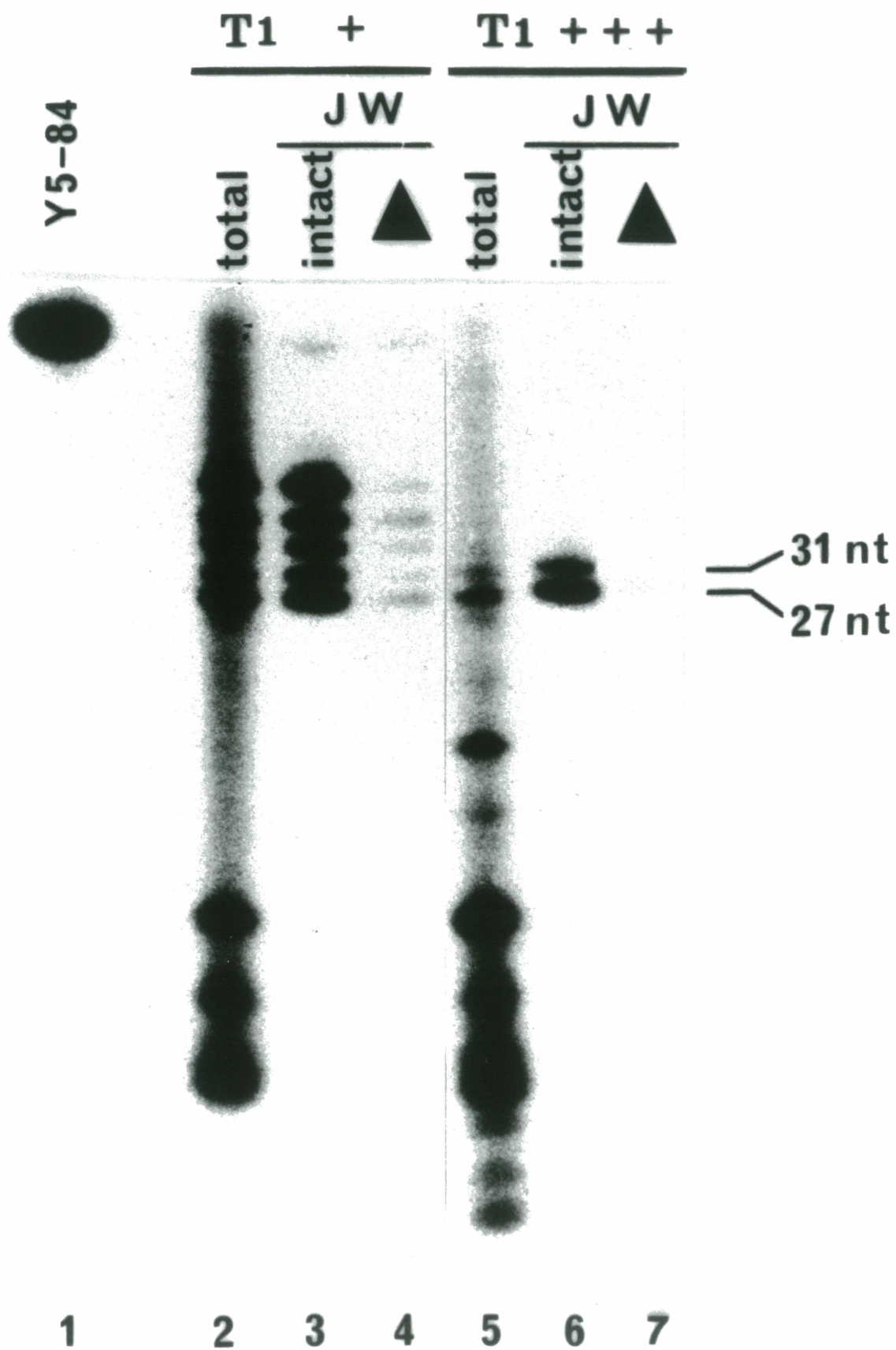


Figure 10. Identification des fragments de 27 et de 31 nt reconnus par le sérum JW

L'ARN Y5-84 digéré partiellement à la RNase T1 est immunoprécipité et les fragments obtenus sont purifiés sur gel. Pour les identifier, chaque fragment est ensuite digéré complètement à la RNase T1 puis fractionné sur gel d'urée-polyacrylamide de 20%. 1, 2 et 3: digestion complète à la RNase T1 de l'ARN Y5-84, du fragment de 31 nt et du fragment de 27 nt respectivement. Le fragment de 31 nt correspond à la séquence de l'ARN hY5 qui est soulignée alors que le fragment de 27 nt correspond à celle qui est doublement soulignée. Les chiffres indiqués au-dessus de la séquence donnent la taille de certains fragments résultant d'une digestion complète à la RNase T1. Puisque la RNase T1 coupe en 3' d'un G en cédant le phosphate à ce G et que l'ARN est marqué avec [α - 32 P]-UTP, un G qui précède un U est marqué.

X: fragment de digestion partielle

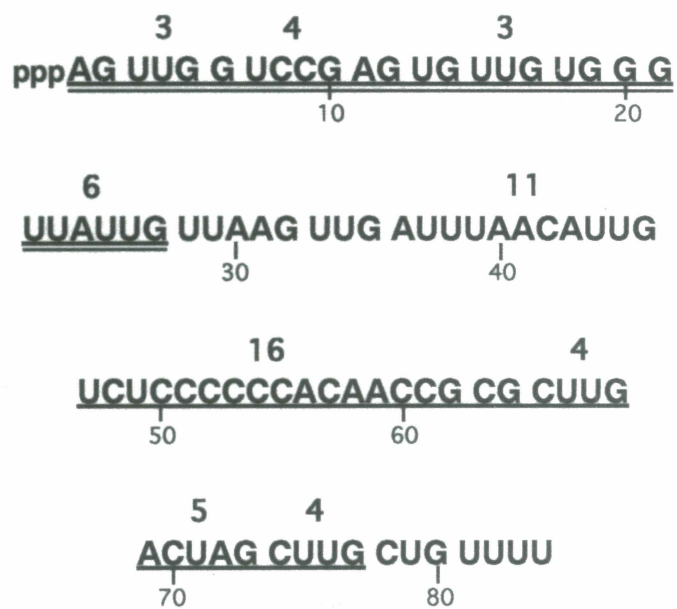
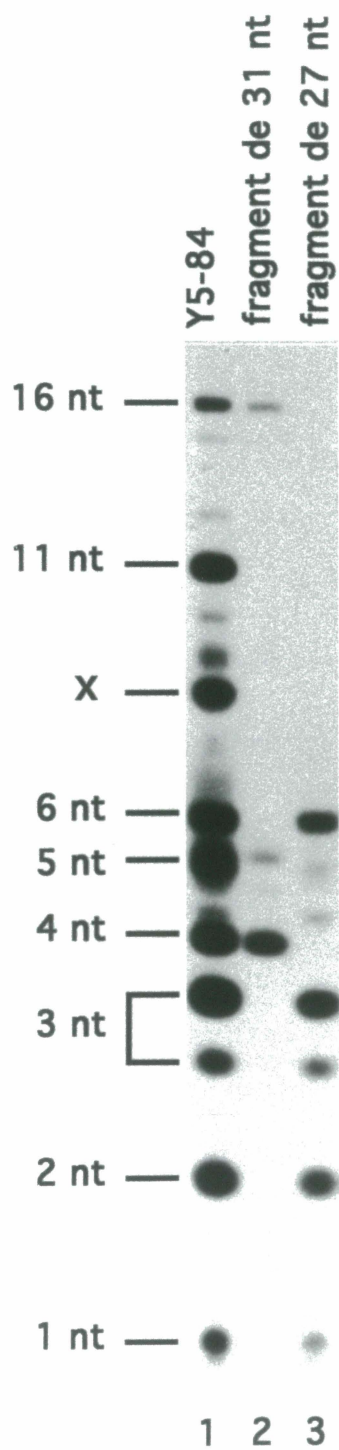




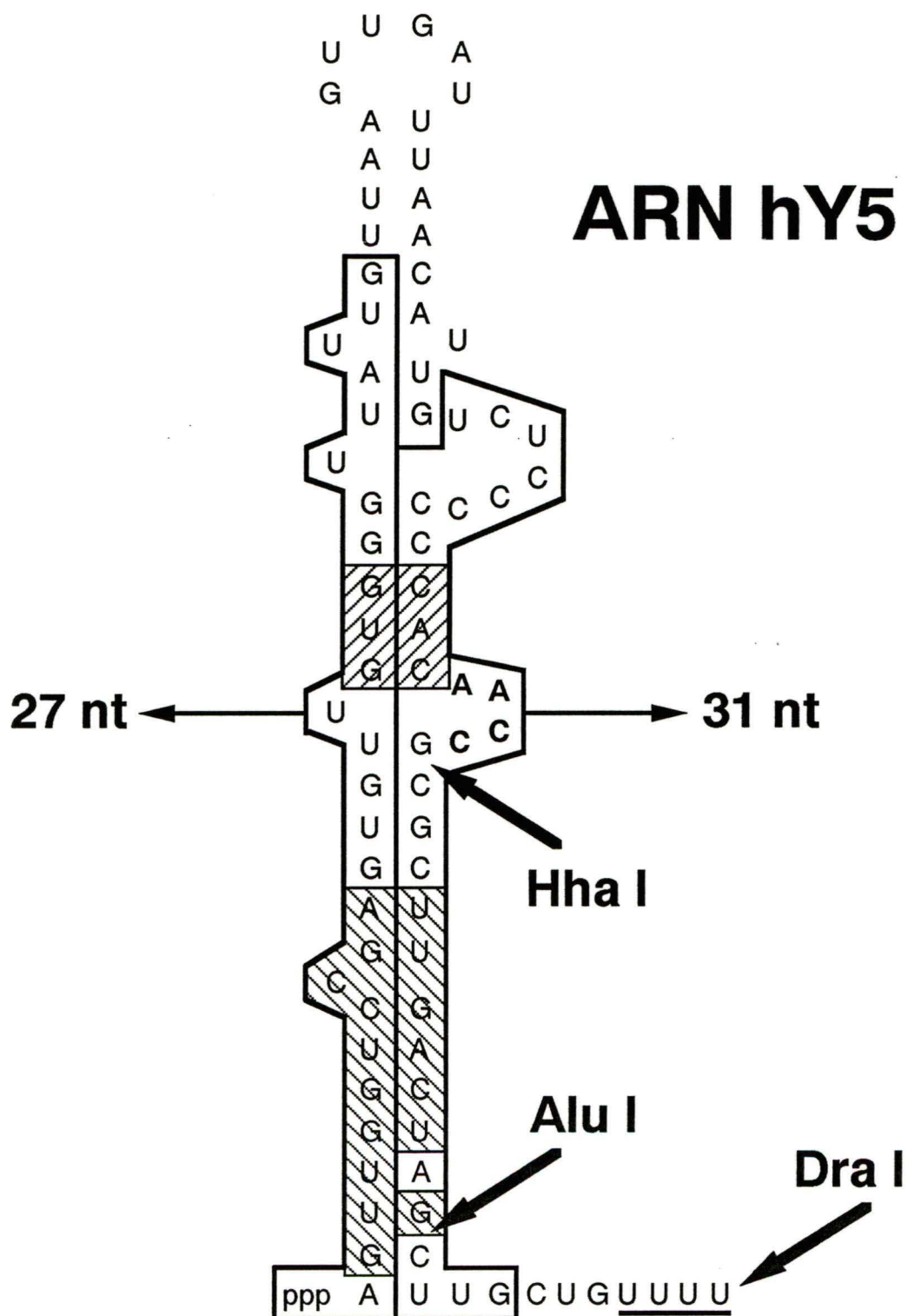


Figure 11. Localisation des fragments de 27 et de 31 nt sur la structure secondaire de l'ARN hY5

Selon les prédictions de structure secondaire de l'ARN hY5, les fragments de 27 et de 31 nt immunoprécipités par les anticorps anti-ARN hY5 sont appariés. Le site de liaison de la protéine La est soulignée. Les nucléotides "AACC" délétés du plasmide pY5-80 sont en caractère gras (près de la flèche indiquant 31 nt).

-  : fragments de 27 et de 31 nt
-  : région conservée entre les ARN Ro contenant le site de liason de la protéine Ro 60 kD
-  : région conservée entre les ARN Ro sans fonction connue
-  : l'extrémité 3' des transcrits produits à partir d'ADN linéarisé avec les enzymes de restriction Hha I, Alu I et Dra I

ARN hY5



de dénaturation à la chaleur et signifie que la partie supérieure ainsi que l'extrémité 3' de l'ARN hY5 ne sont pas essentielles à la reconnaissance par les anticorps anti-ARN hY5.

3.8 RECONNAISSANCE DES ARN MUTANTS Y5-Alu I ET Y5-Hha I

Les ARN Y5-Alu I et Y5-Hha I qui représentent des formes mutantes de l'ARN hY5 ont également été utilisés pour situer l'épitope reconnu par les anti-ARN hY5. À la Figure 12 A, nous constatons que les deux ARN mutants sont reconnus par les anticorps des sérums JW et MD mais qu'en comparaison avec l'ARN Y5-84, l'efficacité d'immunoprécipitation est passablement réduite (plus de 90%). Nous remarquons également que l'ARN Y5-Hha I est moins bien reconnu que l'ARN Y5-Alu I mais cette différence d'antigénicité semble moins importante que celle observée entre les ARN mutants et l'ARN Y5-84. Nous en déduisons que la séquence absente du transcrit Y5-Alu I contribue davantage à la formation de l'épitope que celle qui sépare le site Hha I du site Alu I sur l'ARN (Figure 11). Ce constat est en accord avec l'hypothèse que les sites conservés entre les ARN Ro ne sont pas reconnus par les anticorps anti-ARN hY5 (section 3.3) puisque la séquence qui différencie l'ARN Y5-Hha I de l'ARN Y5-Alu I est essentielle à la formation de la structure qui contient le site d'attachement de la protéine Ro 60 kD.

3.9 COMPARAISON DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR LES ANTICORPS ANTI-ARN hY5 DES SÉRUMS JW ET MD

Les essais d'immunoprécipitation démontrés aux Figures 12 A et 12 B avaient également pour objectif de comparer les épitopes reconnus par les anti-ARN hY5 du sérum JW et du sérum MD. Nous remarquons que l'immunoprécipitation relative des trois transcrits semble très similaire

Figure 12 A. Immunoprécipitation des ARN mutants Y5-Alu I et Y5-Hha I par les sérums JW et MD

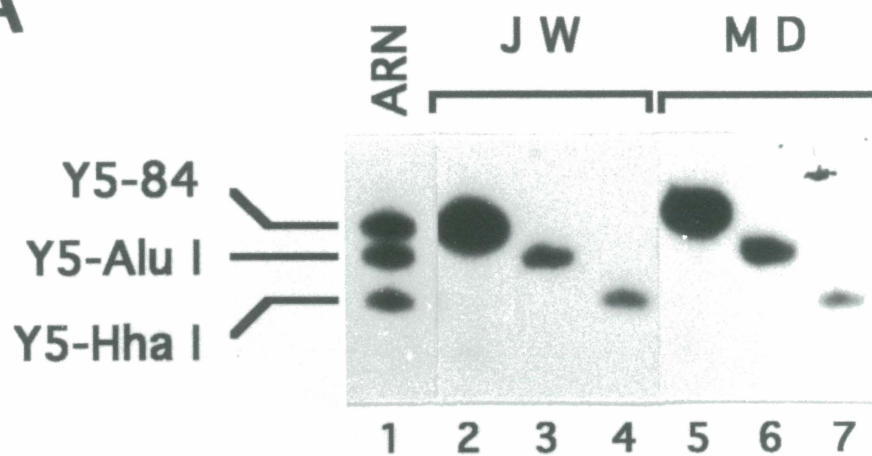
Des quantités équimolaires de chaque ARN sont utilisées lors de l'immunoprécipitation. 1: un mélange des trois ARN utilisés: Y5-84 (84 nt) qui correspond exactement à l'ARN hY5, l'ARN Y5-Alu I (73 nt) et l'ARN Y5-Hha I (62 nt) qui représentent des ARN hY5 tronqués du côté 3'. 2 à 4: les ARN reconnus par le sérum JW. 5 à 7: les ARN reconnus par le sérum MD. 2 et 5: l'ARN Y5-84. 3 et 6: l'ARN Y5-Alu I. 4 et 7: l'ARN Y5-Hha I.

Figure 12B. Immunoprécipitation de fragments de l'ARN Y5-84 produits par la RNase T1

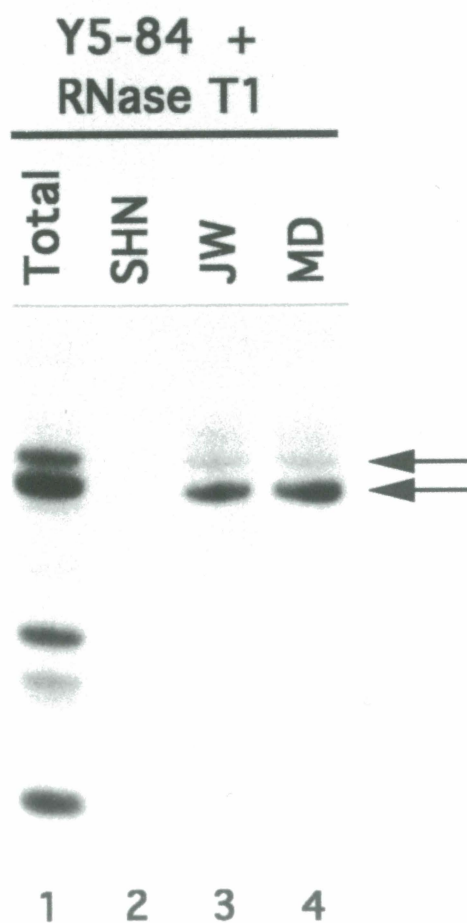
1: les fragments d'ARN utilisés. 2: le sérum négatif (SHN). 3 et 4: les sérums anti-ARN hY5 JW et MD

—▶ : fragments immunoprécipités

A



B



d'un sérum à l'autre (Figure 12 A) et que les fragments de l'ARN Y5-84 reconnus par les deux sérums sont de même taille (Figure 12 B). Ces résultats nous suggèrent que les anti-ARN hY5 présents dans les sérums JW et MD reconnaissent le même épitope.

3.10 COMPARAISON DES ÉPITOPES PRÉSENTS SUR LES ARN Y5-84 ET Y5-Hha I

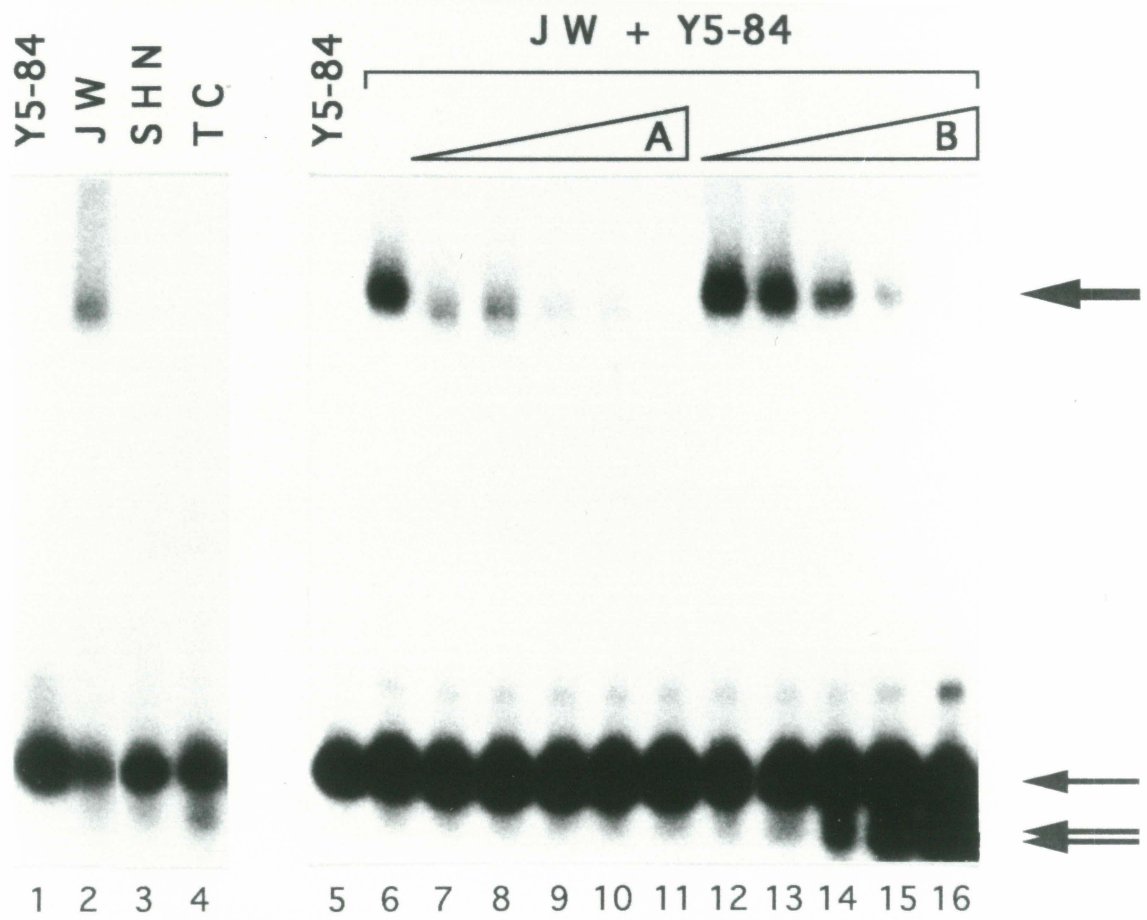
Dans cette étude, nous avons exploité la technique des gels de rétention. Cette technique simple et rapide à réaliser a permis d'obtenir des évaluations quantitatives. La spécificité de la reconnaissance anticorps-ARN est démontrée à la Figure 13. D'une part, seul le sérum JW provoque la formation d'un complexe (lignes 1 à 4) et d'autre part, dans un essai de compétition, l'ARN Y5-84 non marqué (A) inhibe la liaison de l'anticorps à ce même ARN marqué au ^{32}P (lignes 5 à 11). En effet, aucun complexe n'est détecté lorsque la concentration de l'ARN compétiteur (A) excède de 150 fois celle de l'ARN marqué.

Nous avons ensuite poursuivi les essais de compétition afin de vérifier si un seul épitope est reconnu par les anticorps anti-ARN hY5. Puisque l'ARN Y5-Hha I représente le plus court des deux mutants reconnus par les anticorps, nous l'avons utilisé à titre de compétiteur. Les résultats de cette expérience indiquent que l'ARN Y5-Hha I réussit à inhiber complètement la liaison des anticorps à l'ARN Y5-84 (lignes 12 à 16) bien que cette inhibition requière un excès molaire de 5000 fois. Ceci confirme que l'ARN Y5-Hha I porte le seul épitope exprimé sur l'ARN Y5-84.

Figure 13. Spécificité et compétition de la liaison entre l'ARN Y5-84 et l'anticorps anti-ARN hY5 sur gel de rétention

L'ARN qui forme des complexes avec les anticorps est retardé sur le gel. 1: l'ARN Y5-84 seul. 2, 3 et 4: l'ARN Y5-84 avec le sérum anti-ARN hY5 JW, le sérum normal (SHN) et le sérum anti-RNP Ro TC respectivement. Les lignes 5 à 16 représentent des essais d'inhibition de la liaison de l'ARN Y5-84 (marqué au ^{32}P) aux anticorps du sérum JW. 5: l'ARN seul. 6: l'ARN avec le sérum. 7 à 11: l'ARN avec le sérum en présence du compétiteur A: l'ARN Y5-84 non marqué ajouté en excès molaire de 7.5, 15, 30, 75 et 150 fois. 12 à 16: l'ARN et le sérum en présence du compétiteur B: l'ARN Y5-Hha I non marqué ajouté en excès molaire de 50, 100, 500, 1000 et 5000 fois. Une petite quantité de ^{32}P a été ajoutée lors de la synthèse des ARN compétiteurs afin de faciliter leur purification (1000 fois moins que lors d'une transcription normale). Ainsi l'ARN Y5-Hha I utilisé en grandes quantités se détecte sur l'autoradiogramme.

—▶: l'ARN Y5-84 lié à l'anticorps anti-ARN hY5
 —▶: l'ARN Y5-84 libre
 ==▶: l'ARN Y5-Hha I libre




3.11 SITUATION DE L'ÉPITOPE SUR L'ARN hY5 ET RECONNAISSANCE DE L'ARN Y5-80

L'ensemble des résultats obtenus nous amène à proposer que les anticorps anti-ARN hY5 reconnaissent un seul épitope conformationnel. Cet épitope est constitué par deux régions distinctes de l'ARN hY5 qui bordent le site d'attachement de la protéine Ro 60 kD (Figure 14). La partie supérieure de la molécule ainsi que les séquences conservées entre les ARN Ro seraient exclues de l'épitope. Afin de vérifier si une délétion de la boucle "AACC" de l'épitope pouvait supprimer la reconnaissance par les anticorps, nous avons créé le plasmide pY5-80. Nous avons choisi d'éliminer ces 4 nucléotides parce que cette modification n'entraîne pas de changement majeur de la structure secondaire et parce que les régions protubérantes des ARN sont souvent reconnues par des protéines (Kenan et al., 1991). La position des nucléotides éliminés de l'ARN hY5 et les résultats du séquençage de l'ADN de pY5-80 sont montrés aux Figures 11 et 15 A, respectivement. Nous constatons que les ARN Y5-80 et Y5(80)-Alu I produits à partir de pY5-80 sont reconnus par les anticorps anti-ARN hY5 (Figure 15 B). La comparaison de l'immunoprécipitation de ces deux mutants à celle des ARN Y5-84 et Y5-Alu I, nous amène à conclure que la boucle "AACC" ne contribue pas de façon significative à la formation de l'épitope.

Figure 14. Schéma représentant l'épitope de l'ARN hY5 reconnu par les anticorps anti-ARN hY5

Schéma de l'ARN hY5 en structure secondaire. Les protéines Ro 60 kD et La liées à l'ARN sont représentées par des cercles.

 : régions comprenant l'épitope

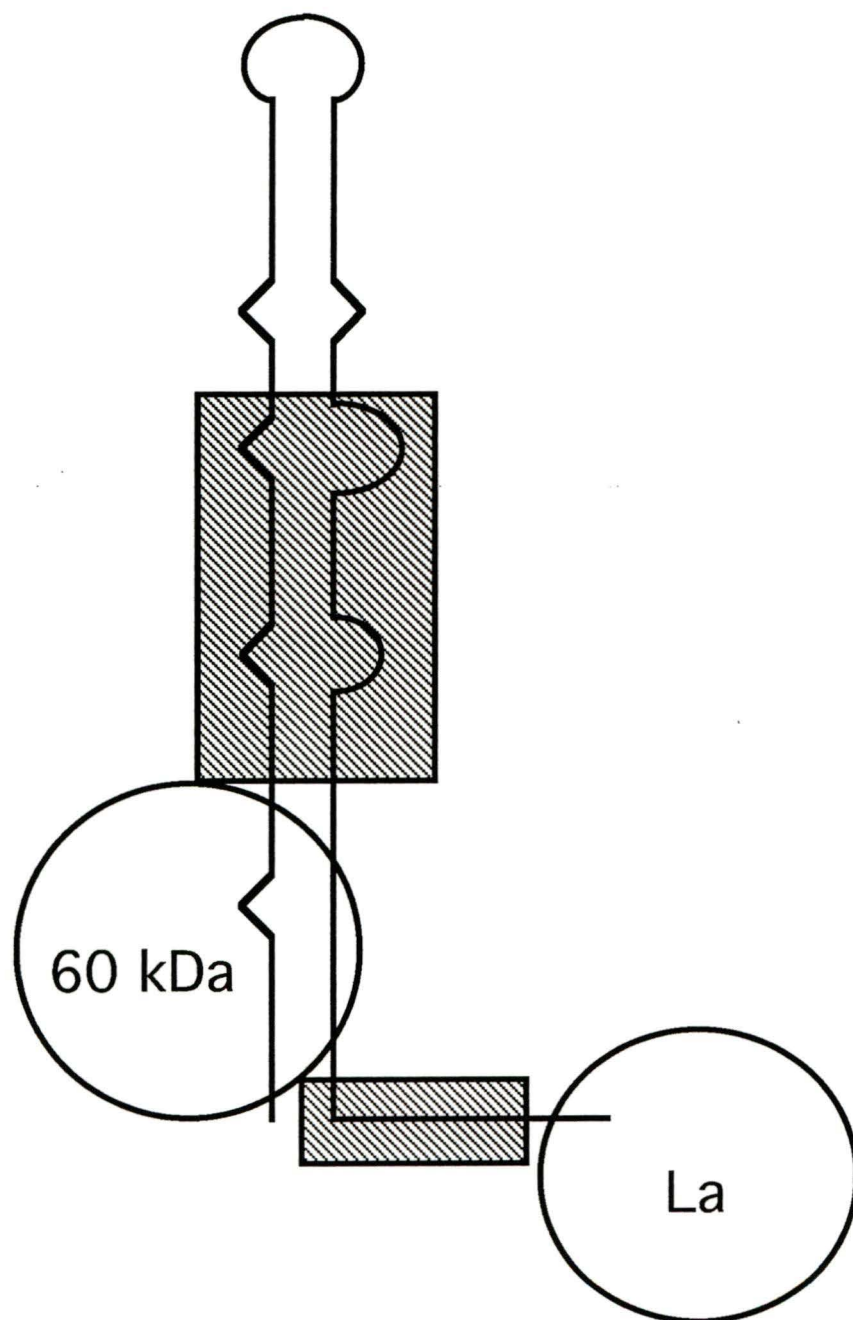


Figure 15 A. Séquençage de l'ADN du plasmide pY5-80

Le plasmide pY5-80 correspond à un mutant de délétion du plasmide pY5-84. Les lignes 1 à 4 représentent les séquences adjacentes au site de la délétion et les nucléotides délétés sont encadrés. Les échantillons sont marqués au ^{32}P .

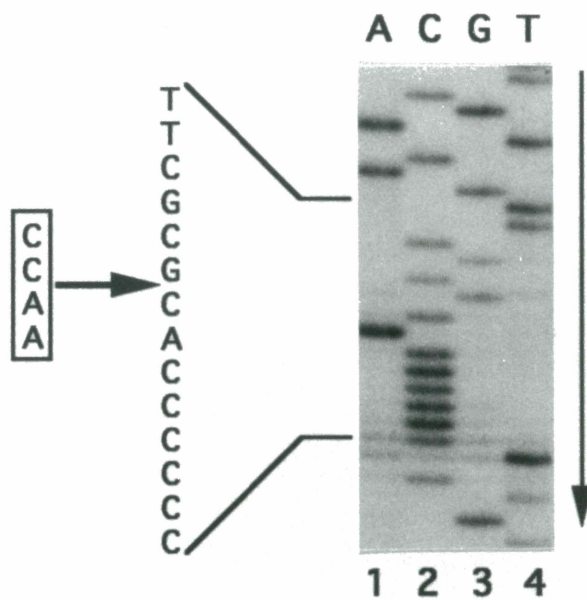
—▶: direction 3' vers 5'
 —▶: position de la délétion

Figure 15 B. Immunoprécipitation comparée des ARN transcrits à partir de pY5-84 et de pY5-80

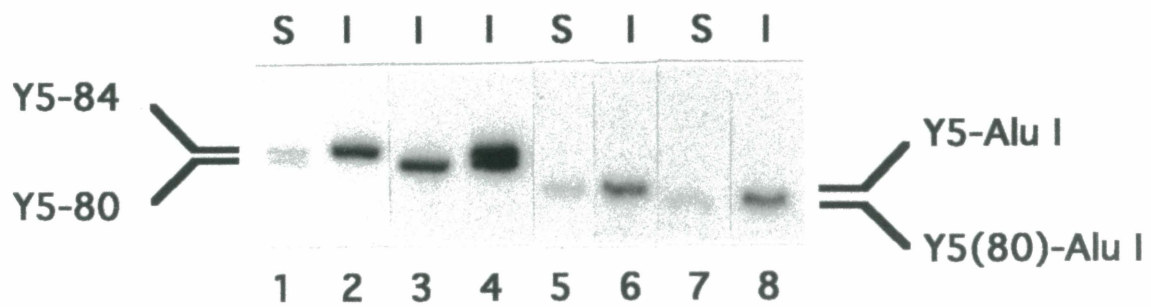
Les ARN Y5-84 (84 nt) et Y5-80 (80 nt) sont produits respectivement à partir des plasmides pY5-84 et pY5-80 linéarisés avec l'enzyme Dra I. Les ARN Y5-Alu I (73 nt) et Y5(80)-Alu I (69 nt) sont produits respectivement à partir des plasmides pY5-84 et pY5-80 linéarisés avec l'enzyme Alu I. 1 et 4: les ARN Y5-84 et Y5-80 ont été mélangés avant l'immunoprécipitation.

S: antigène utilisé (lignes 1, 5 et 7)
 I: antigène immunoprécipité (lignes 2-4, 6 et 8)

A



B



4. DISCUSSION

Le but du présent travail consistait à caractériser des autoanticorps dirigés spécifiquement contre l'ARN hY5, une des composantes des RNP Ro. Ces anticorps représentent à la fois une nouvelle classe d'anticorps anti-Ro et une nouvelle classe d'anticorps anti-ARN spécifique. Pour ce faire, nous avons cloné l'ADNc de l'ARN hY5, identifié d'autres sérums ayant la même spécificité et défini partiellement par différentes techniques le déterminant antigénique reconnu par les anticorps anti-ARN hY5.

La reconnaissance spécifique de l'ARN hY5 par les anticorps a tout d'abord été observée avec le sérum du patient JW. Dans ce sérum, les anticorps anti-protéines Ro coexistent avec les anticorps anti-ARN hY5. Tel que démontré à la Figure 4, le sérum JW immunoprécipite les RNP Ro^{hY1-5} d'un extrait cellulaire (ligne 4). Lorsque des ARN Ro purifiés et déprotéinisés sont utilisés comme source d'antigène, le sérum JW immunoprécipite uniquement l'ARN hY5 (ligne 6). La reconnaissance est spécifique puisque le sérum JW reconnaît seulement l'ARN hY5 et qu'aucun ARN n'est immunoprécipité par le sérum normal ou par le sérum anti-Ro témoin (lignes 5 et 7).

Afin d'identifier d'autres sérums anti-ARN hY5 et d'évaluer la fréquence de cette spécificité, nous avons analysé 56 sérums provenant de différents patients. Les résultats obtenus indiquent que les sérums anti-ARN hY5 sont retrouvés à une prévalence d'environ 10% parmi les sérums anti-Ro. Cependant, 3 des 5 sérums identifiés immunoprécipitent également d'autres ARN (Figures 8 A et 8 B, lignes 5 à 7). Ceci suggère

que pour confirmer la spécificité anti-ARN hY5 de ces sérums, il serait nécessaire d'effectuer d'autres essais. Par exemple, en augmentant les quantités d'ARNt et d'héparine à l'immunoprécipitation ou encore en effectuant un essai de compétition avec de l'ARN hY5 froid, comme celui réalisé en gel de rétention avec le sérum JW (Figure 13, lignes 6 à 11), il pourrait être possible de confirmer l'identité des anticorps. Par ailleurs, certains sérums reconnaissent en plus l'ARN U1 (Figure 8 A, lignes 3, 5 et 6). Cette observation est intéressante car van Venrooij et ses collaborateurs (1990) ont affirmé que les anticorps anti-U1 étaient présents seulement dans les sérums anti-RNP U1. L'étude de cette reconnaissance par immunoprécipitation d'ARN U1 synthétisés *in vitro* pourrait donc permettre de vérifier cette affirmation. Finalement, il serait intéressant de poursuivre l'identification de sérums anti-ARN hY5 puisqu'elle permettrait une meilleure évaluation de la prévalence de ces anticorps.

Les différents prélèvements du sérum JW que nous avons analysés immunoprécipitent des quantités variables d'ARN hY5 (Figure 7, lignes 3 à 11). Ce résultat suggère une variation du titre des anticorps anti-ARN hY5 en fonction du temps. L'analyse de cette fluctuation par rapport à l'évolution de la maladie devrait faire l'objet d'une prochaine étude puisqu'une corrélation entre la fluctuation du titre des anticorps anti-ARN U1 et l'activité de la maladie a déjà été démontrée par Hoet et al. en 1991. Compte tenu que 4 des 5 sérums anti-ARN hY5 identifiés ont été prélevés chez des patients atteints de LED sévère, un outil pronostique très intéressant pourrait être développé si une telle corrélation se confirme. Dans un autre ordre d'idée, une comparaison du titre des anti-ARN hY5 à celle des anticorps dirigés contre les protéines Ro pourrait permettre d'évaluer si ces deux types d'anticorps suivent les mêmes

phases de production et pourrait éventuellement permettre de mieux comprendre les processus impliqués dans la production de ces anticorps.

Une des premières données concernant la définition de l'épitope reconnu par les anti-ARN hY5 nous a été fournie par l'ARN Y5-125. Nous avons observé que cet ARN, un mutant de l'ARN hY5, n'est pas antigénique. En faisant exception du premier prélèvement du sérum JW (Figure 7, lignes 3) qui semble reconnaître de façon non spécifique les ARN 3Zf-229 et Y5-125, les anticorps des sérums JW n'immunoprécipitent pas l'ARN Y5-125 (lignes 4 à 11). Selon la structure secondaire prédite de l'ARN Y5-125, les séquences supplémentaires à chaque extrémité seraient appariées à des séquences de l'ARN hY5 entraînant une modification importante de la structure originale de l'ARN hY5 (Figure 6). Les anticorps anti-ARN hY5 ne reconnaissent pas simplement une séquence d'ARN puisque la séquence entière de l'ARN hY5 est présente dans l'ARN Y5-125 et que ce dernier n'est pas immunoprécipité. Nous supposons donc que les anticorps anti-ARN hY5 reconnaissent un épitope conformationnel non exprimé par l'ARN Y5-125. Il est aussi possible que le réarrangement de la structure secondaire qui supprime l'antigénicité de l'ARN Y5-125 produise un encombrement stérique rendant ainsi l'épitope inaccessible aux anticorps.

Dans le but d'identifier la plus petite région de l'ARN hY5 représentant l'épitope, l'ARN hY5 a été fragmenté avec la RNase T1 et immunoprécipité. Nous avons identifié un fragment de 31 nt et un fragment de 27 nt (Figure 9, lignes 3 et 6 et Figure 10). De plus, ces deux fragments représentent des séquences qui sont en grande partie appariées l'une à l'autre si on se réfère à la structure secondaire prédite de l'ARN hY5 (Figure 11). Cet appariement serait d'ailleurs requis pour la reconnaissance par les anti-ARN hY5 puisque l'antigénicité est abolie lorsque ces deux fragments sont

dénaturés par la chaleur avant l'immunoprécipitation (Figure 9, ligne 4 et 7). La conformation de l'ARN semble donc essentielle à l'expression de cet épitope.

Une autre observation intéressante concerne la partie supérieure de l'ARN hY5 qui ne semble pas faire partie de l'épitope. Cette région est intacte chez l'ARN Y5-125 non reconnu par les anticorps (Figure 6) et absente des fragments de 31 et de 27 nt qui eux portent l'épitope (Figure 11). Cette observation n'est cependant valable que pour les sérums JW et MD qui reconnaissent le même épitope (Figure 8 B, lignes 3 et 4 et Figure 12 A et B). En effet, les résultats préliminaires obtenus avec les sérums SM, EB et JB donnent des résultats différents car ces sérums reconnaissent l'ARN Y5-125 (Figure 8 B, lignes 5 à 7) et la partie supérieure de l'ARN hY5 pourrait donc faire partie de l'épitope reconnu par ces sérums.

Afin de réduire le déterminant antigénique déjà identifié par l'immunoprécipitation des fragments appariés de 31 nt et de 27 nt, nous avons analysé l'antigénicité de deux mutants de l'ARN hY5, les ARN Y5-Alu I et Y5-Hha I. Ces deux mutants sont des formes raccourcies à l'extrémité 3' de l'ARN hY5 (Figure 11) et leur structure secondaire se conforme essentiellement à celle de l'ARN hY5. Des quantités équimolaires des ARN Y5-84, Y5-Alu I et Y5-Hha I utilisées en immunoprécipitation ont permis de démontrer que l'ARN hY5 tronqué à son extrémité 3' est toujours reconnu par les anticorps des sérums JW et MD (Figure 12 A). Cependant, les ARN Y5-Alu I et Y5-Hha I ne sont pas immunoprécipités avec la même efficacité que l'ARN Y5-84 et cette différence reflète l'antigénicité relative de chacun.

Une des premières observations qui découle de ce résultat concerne la séquence de l'extrémité 3' qui est absente chez les deux ARN mutants et dont fait partie le site d'attachement de la protéine La. La diminution de l'efficacité avec laquelle les ARN sont immunoprécipités suggère que cette région de l'ARN hY5 est impliquée dans la reconnaissance par les anticorps. Étant donné que l'interaction ARN-anticorps n'est pas abolie en l'absence de cette séquence mais plutôt réduite de façon significative, nous en déduisons que cette région pourrait participer au maintien de l'épitope sans toutefois être essentielle à son expression. Il est à noter que nous avons aussi observé que cette séquence est également absente (à quelques bases près) du fragment de 31 nt qui constitue, lorsqu'apparié avec le fragment de 27 nt, la région antigénique (Figure 11), ce qui va aussi dans le sens de notre hypothèse.

La séquence qui différencie l'ARN Y5-Alu I de l'ARN Y5-Hha I ne semble pas impliquée directement dans la formation de l'épitope. La perte de cette séquence entraîne une réduction de liaison des anticorps mais cette réduction est beaucoup moins importante que celle qui s'observe lors de la délétion de la séquence en 3' du site Alu I. Ce résultat suggère, d'une part, que l'ARN Hha I pourrait porter à lui seul l'épitope reconnu par les anti-ARN hY5 et, d'autre part, que le site très conservé de liaison de la protéine Ro 60 kD ne fait pas partie de l'épitope. L'exclusion du site d'attachement du Ro 60 kD est en accord avec le fait que les autres ARN Ro qui contiennent eux aussi cette région ne sont pas reconnus par ces anticorps (Figure 4, ligne 6). Cela pourrait signifier que les anti-ARN hY5 ne sont pas des anticorps anti-idiotypiques. Si cela avait été le cas, les anti-ARN hY5 auraient été produits initialement contre la région idiotype des anticorps qui reconnaissent la région de la protéine Ro 60 kD liant l'ARN hY5. Du fait que l'idiotype des anticorps dirigés contre la

région de la protéine Ro 60 kD liant l'ARN hY5 imite la structure de l'ARN, c'est par mimétisme moléculaire que les anticorps anti-idiotypes reconnaîtraient l'ARN hY5 et ils seraient donc dirigés contre la région de l'ARN liant la protéine Ro 60 kD. Nos résultats vont donc à l'encontre de cette hypothèse.

En résumé, l'épitope que nous avons défini serait localisé au centre de l'ARN hY5 excluant la partie supérieure de la molécule et le site de liaison de la protéine Ro 60 kD. L'extrémité 3' participerait au maintien de l'épitope soit par une interaction directe avec l'anticorps soit en stabilisant une structure de l'ARN hY5 favorable à la reconnaissance par les anticorps (Figure 14).

Afin de vérifier si l'ARN Y5-Hha I exprime effectivement à lui seul l'épitope de l'ARN hY5, nous avons réalisé des essais de compétition en gel de rétention. En supposant que l'ARN Hha I porte l'épitope, cet ARN devait compétitionner avec l'ARN hY5 pour sa liaison avec l'anticorps. Tel que nous l'avons montré à la Figure 13, l'ARN Hha I non marqué bloque complètement l'interaction entre l'ARN hY5 marqué au ^{32}P et les anticorps anti-ARN hY5 du sérum JW (lignes 12 à 16). Cette compétition exige toutefois une quantité d'ARN Hha I excédant de 5000 fois celle de l'ARN Y5-84, alors que dans les mêmes conditions expérimentales, la compétition entre l'ARN Y5-84 marqué au ^{32}P et l'ARN Y5-84 non marqué nécessite un excès de 150 fois (lignes 7 à 11). La capacité de l'ARN Y5-Hha I à compétitionner totalement suggère donc qu'il contient l'épitope reconnu par les anticorps dirigés contre l'ARN hY5. Ceci permet d'affirmer que la région 3' absente dans l'ARN Y5-Hha I ne constitue pas un épitope différent mais contribue à stabiliser l'interaction ARN-anticorps.

Nous tenons à souligner que l'identification de sérums contenant des anticorps anti-ARN spécifiques pourrait se faire avantageusement à l'aide de la technique du gel de rétention qui est simple à utiliser. Par cette technique, plusieurs sérums peuvent être analysés simultanément et plus rapidement que par immunoprécipitation. Cette technique pourrait également permettre de purifier des anticorps anti-ARN car la rétention dans le gel est en soi une forme de purification. Des anti-ARN hY5 purifiés pourraient notamment être utilisés en présence de protéines Ro purifiées pour déterminer si ces anticorps interagissent avec la RNP Ro ou seulement avec l'ARN. Sans les anticorps anti-ARN purifiés, il n'est pas possible actuellement d'effectuer de tels essais, étant donné que les sérums contiennent aussi des anticorps anti-protéines Ro.

Notre démarche de caractérisation de l'épitope nous a ensuite amenés à étudier la contribution d'une région particulière de l'épitope. En comparant l'immunoprécipitation d'ARN produits par le mutant pY5-80 et celle d'ARN produits par le plasmide pY5-84, nous avons constaté que l'absence de la boucle "AACC" n'affecte pas de façon significative la reconnaissance par les anticorps anti-ARN hY5 (Figure 15 B). La boucle "AACC" qui est située directement dans la région antigénique ne serait donc pas une composante de l'épitope. Ce résultat suggère la possibilité que l'ARN puisse subir certaines modifications dans la région de l'épitope sans que la reconnaissance par les anticorps en soit affectée, à condition que ces modifications ne déstabilisent pas la conformation de la molécule. Il est donc possible que l'hélice formée par l'appariement des séquences soit la structure reconnue plutôt que les bases de façon directe. D'autres mutations pourraient être réalisées dans la région antigénique afin de vérifier cette hypothèse. Il serait ainsi possible de comparer les conséquences des mutations déstabilisantes de la structure

et celles des mutations non déstabilisantes (substitutions de paires de bases) pour savoir si ce sont des séquences ou la conformation de l'ARN qui déterminent l'antigénicité. Il est fort probable que la structure et la séquence de l'ARN hY5 exprime ensemble l'épitope reconnu par les anticorps anti-ARN hY5.

Tout au long de ce travail nous avons évalué la structure secondaire des ARN à l'aide des prédictions du programme FOLD (Zuker et Stiegler, 1981). Ce programme informatisé représente actuellement un outil fort utile à l'étude de l'ARN bien qu'il comporte aussi certaines limitations. Premièrement, une prédiction obtenue par FOLD demeure une indication de la structure secondaire qui est la plus probable et par conséquent, ne tient pas compte de la possibilité qu'un ARN puisse adopter simultanément d'autres structures secondaires. Deuxièmement, une analyse basée uniquement sur cette prédiction fait abstraction de l'arrangement tridimensionnel de l'ARN. Il faut donc considérer que l'interprétation de certaines données dépend de la fiabilité du modèle utilisé. Toutefois, l'information que nous avons obtenue sur l'ARN hY5 par ce programme (Figure 11) s'est avérée conforme à celle obtenue par des expériences de protection aux RNases effectuées antérieurement (Wolin et Steitz, 1984), ce qui suggère que l'interprétation de nos résultats est valide.

L'ensemble des observations que nous avons réalisées nous amène enfin à conclure que les anticorps anti-ARN hY5 du sérum JW reconnaissent un seul épitope, que cet épitope est conformationnel et qu'il est délimité à deux régions adjacentes aux deux extrémités du site de liaison de la protéine Ro 60 kD. Compte tenu qu'aucune molécule liant l'ARN hY5 à ce site n'a été identifiée jusqu'à maintenant, on peut considérer que les

régions antigéniques sont libres et disponibles pour interagir avec d'autres molécules. La localisation de cet épitope suggère également que les autoanticorps anti-ARN hY5 seraient produits suite à une immunisation directe par la RNP Ro^{hY5}. Ce mécanisme avait déjà été suggéré pour la production des anticorps anti-Ro lorsque des sérums reconnaissant spécifiquement la RNP Ro^{hY5} ont été identifiés (Boire et Craft, 1990). De plus, l'immunisation directe par l'antigène serait aussi le mécanisme de production de la majorité des anticorps anti-ARN (Hoet et al., 1992). La caractérisation d'autres anticorps anti-ARN hY5 pourrait certainement apporter de nouveaux éléments sur les mécanismes impliqués et pourrait appuyer nos observations. Le fait que les ARN hY1, 3 et 4 ne sont pas ciblés par des autoanticorps alors que la RNP Ro^{hY5} est vraisemblablement immunogénique demeure un point à élucider.

Ce travail représente un premier pas dans l'étude de ce nouveau type d'autoanticorps anti-Ro et s'inscrit dans une démarche de recherche en rhumatologie qui vise à mieux connaître les RNP Ro en tant qu'autoantigène. De plus, les différentes constructions plasmidiques réalisées pour caractériser les autoanticorps anti-ARN hY5 pourront également servir à l'étude des interactions se produisant au sein des RNP Ro. Dans une perspective plus large, ces connaissances contribueront à mieux comprendre les dysfonctions du système immunitaire qui conduisent à l'autoimmunité.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux professeurs Gilles Boire et Benoît Chabot qui ont accepté de diriger mes travaux et qui m'ont initiée à la recherche.

Je tiens à remercier Maryse Gendron, Hélène La Branche et Alain Lavigueur pour leurs précieux conseils et leurs encouragements. Je remercie également toute l'équipe du service de Rhumatologie pour son appui constant.

Je remercie aussi les organismes qui m'ont accordé une aide financière pour la réalisation de cette recherche soit, la Fondation du Docteur Georges Phénix et le Fonds FCAR (Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche).

RÉFÉRENCES

- Alspaugh, M.A., N. Tatal et E.M. Tan (1976). Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222.
- Alspaugh, M.A. et E.M. Tan (1975). Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073.
- Alspaugh, M. et P. Maddison (1979). Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum.* 22:796-798.
- Ben-Chetrit, E., B.J. Gandy, E.M. Tan et K.F. Sullivan (1989). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* 83:1284-1292.
- Ben-Chetrit, E., E.K.L. Chan, K.F. Sullivan et E.M. Tan (1988). A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* 167:1560-1571.
- Boire, G. et J. Craft (1989). Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. *J. Clin. Invest.* 84:270-279.
- Boire, G. et J. Craft (1990). Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J. Clin. Invest.* 85:1182-1190.
- Boire, G., F.J. Lopez-Longo, S. Lapointe et H.A. Ménard (1991). Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kd Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum.* 34:722-730.
- Bunn, C.C. et M.B. Mathews (1987). Autoreactive epitope defined as the anticodon region of alanine transfer RNA. *Science* 238:1116-1119.
- Bunn, C.C., R.M. Bernstein et M.B. Mathews (1986). Autoantibodies against alanyl-tRNA synthetase and tRNA^{Ala} coexist and are associated with myositis. *J. Exp. Med.* 163:1281-1291.

- Buyon, J.P. et R. Winchester (1990). Congenital complete heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury. *Arthritis Rheum.* 33:609-614.
- Chabot, B. RNA processing: a practical approach. Hames, D. et S. Higgins Editors, Oxford University press, Oxford. (sous presse).
- Chabot, B., D. Frappier et H. La Branche (1992). Differential ASF/SF2 activity in extracts from normal WI38 and transformed WI38VA13 cells. *Nucleic Acids Res.* 20:5197-5204.
- Chambers, J.C., D. Kenan, B.J. Martin et J.D. Keene (1988). Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* 263:18043-18051.
- Chan, E.K.L. et L.E.C. Andrade (1992). Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 18:551-570.
- Chan, E.K.L., J.C. Hamel, J.P. Buyon et E.M. Tan (1991). Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J. Clin. Invest.* 87:68-76.
- Chu, J.L., N. Brot, H. Weissbach et K. Elkon (1991). Lupus antiribosomal P antisera contain antibodies to a small fragment of 28S rRNA located in the proposed ribosomal GTPase center. *J. Exp. Med.* 174:507-514.
- Clark, G., M. Reichlin et T.B. Tomasi Jr. (1969). Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122.
- Deutscher, S.L. et J.D. Keene (1988). A sequence-specific conformational epitope on U1 RNA is recognized by a unique autoantibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3299-3303.
- Deutscher, S.L., J.B. Harley et J.D. Keene (1988). Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9479-9483.
- Devereux, J., P. Haeberli et O. Smithies (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-305.
- Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker et J.S. Mattick (1991). "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.

- Dziarski, R. (1988). Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction. *Immunol. Today* 9:340-342.
- Furukawa, F., M. Kashihara-Sawami, M.B. Lyons et D.A. Norris (1990). Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J. Invest. Dermatol.* 94:77-85.
- Furukawa, F., M.B. Lyons, L.A. Lee, S.N. Coulter et D.A. Norris (1988). Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. *J. Immunol.* 141:1480-1488.
- Gottlieb, E. et J.A. Steitz (1989). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 8:851-861.
- Hardin, J.A. (1986). The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 29:457-460.
- Harley J.B., R.H. Scofield et M. Reichlin (1992). Anti-Ro in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18:337-358.
- Harmon, C.E., J.S. Deng, C.L. Peebles et E. M. Tan. (1984). The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173.
- Hendrick, J.P., S.L. Wolin, J. Rinke, M.R. Lerner et J.A. Steitz (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1:1138-1149.
- Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen et L.R. Pease (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
- Hoet, R.M. et W.J. van Venrooij (1992). B-cell epitopes of RNA autoantigens. *Mol. Biol. Reports* 16:199-205.

- Hoet, R.M., I. Koornneef, D.J. de Rooij, L.B. van de Putte et W.J. van Venrooij (1992a). Changes in anti-U1 RNA antibody levels correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus overlap syndrome. *Arthritis Rheum.* 35:1202-1210.
- Hoet, R.M., P. De Weerd, J. Klein Gunnewiek, I. Koornneef et W.J. van Venrooij (1992b). Epitope regions on U1 small nuclear RNA recognized by anti-U1 RNA-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 90:1753-1752.
- Itoh, K., Y. Itoh et M.B. Frank (1991). Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J. Clin. Invest.* 87:177-186.
- Itoh, Y., M.D. Rader et M. Reichlin (1990). Heterogeneity of the Ro/SSA antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence for the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51.
- Itoh, Y. et M. Reichlin (1991). Ro/SS-A antigen in human platelets. Different distributions of the isoforms of Ro/SS-A protein and the Ro/SS-A-binding RNA. *Arthritis Rheum.* 34:888-893.
- Kato, N., H. Hoshino et F. Harada (1982). Nucleotide sequence of 4.5S RNA (C8 or hY5) from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108:363-370.
- Kenan, D.J., C.C. Query et J.D. Keene (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16:214-220.
- Koffler, D., V. Agnello et H.G. Kunkel (1974). Polynucleotide immune complexes in serum and glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Pathol.* 74:109-124.
- Lee, L.A., C.E. Harmon, J.C. Huff, D.A. Norris et W.L. Weston (1985). The demonstration of SS-A/Ro antigen in human fetal tissues and in neonatal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* 85:143-146.
- Lee, L.A., K.K. Gaither, S.N. Coulter, D.A. Norris et J.B. Harley (1989). Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing purified anti-Ro (SSA) autoantibodies into human skin-grafted mice. *J. Clin. Invest.* 83:1556-1562.

- Lee, L.A., W.L. Weston, G.G. Krueger, M. Emam, M. Reichlin, J.O. Stevens, S.K. Surbrugg, A. Vasil et D.A. Norris (1986). An animal model of antibody binding in cutaneous lupus. *Arthritis Rheum.* 29:782-788.
- LeFeber, W.P., D.A. Norris, S.R. Ryan, J.C. Huff, L.A. Lee, M. Kubo, S.T. Boyce, B.L. Kotzin et W.L. Weston (1984). Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 74:1545-1551.
- Lerner, M.R., J.A. Boyle, J.A. Hardin et J.A. Steitz (1981). Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 211:400-402.
- Mamula, M.J., C.A. O'Brien, J.B. Harley et J.A. Hardin (1989). The Ro ribonucleoprotein particle: induction of autoantibodies and the detection of Ro RNAs among species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52:435-446.
- Mamula, M.J., E.D. Silverman, R.M. Laxer, L. Bentur, B. Isacovics et J.A. Hardin (1989). Human monoclonal anti-La antibodies. The La protein resides on a subset of Ro particles. *J. Immunol.* 143:2923-2928.
- Mattioli, M. et M. Reichlin (1974). Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 17:421-429.
- Naparstek, Y. et P.H. Plotz (1993). The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.* 11:79-104.
- O'Brien, C.A. et J.B. Harley (1990). A subset of hY RNAs is associated with erythrocyte Ro ribonucleoproteins. *EMBO J.* 9:3683-3689.
- Okano, Y. et T.A. Medsger Jr. (1992). Novel human autoantibodies reactive with 5'-terminal trimethylguanosine cap structures of U small nuclear RNA. *J. Immunol.* 149:1093-1098.
- Pizer, L.I., J.S. Deng, R.M. Stenberg, et E.M. Tan (1983). Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and uninfected KB cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:1235-1245.
- Plotz, P.H. (1992). The role of autoantigens in the induction and maintenance of autoimmunity. *Mol. Biol. Reports* 16:127-132.

- Pruijn, G.J.M., R.L. Slobbe et W.J. van Venrooij (1991). Analysis of protein-RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 19:5173-5180.
- Rader, M.D., C. O'Brien, Y. Liu, J.B. Harley et M. Reichlin (1989). Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 83:1293-1298.
- Reichlin, M. (1986). Significance of the Ro antigen system. *J. Clin. Immunol.* 6:339-348.
- Robinson, D.R Scientific American Medicine: Immunologic tolerance and autoimmunity. Scientific American Inc., New York (1987).
- Roitt, I. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1991). p.305-310.
- Saitta, M.R. et J.D. Keene (1992). Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18:283-310.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition. C. Nolan, Editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
- Sanger, F., S. Nicklen et A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Slobbe, R.L., G.J.M. Pruijn et W.J. van Venrooij (1991). Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes: structure, function and antigenicity. *Ann. Med. Interne* 142:592-600.
- Slobbe, R.L., W. Pluk, W.J. van Venrooij et G.J.M. Pruijn (1992). Ro ribonucleoprotein assembly *in vitro*. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 227:361-366.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36:145-154.
- Stollar, B.D. (1980). The experimental induction of antibodies to nucleic acids. *Meth. Enzymol.* 70:70-85.

- Tan, E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93-151.
- Tan, E.M. (1991). Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
- Uchiumi, T., R.R. Traut, K. Elkon et R. Kominami (1991). A human autoantibody specific for a unique conserved region of 28S ribosomal RNA inhibits the interaction of elongation factors 1 α and 2 with ribosomes. *J. Biol. Chem.* 266:2054-2062.
- van Venrooij, W.J., R. Hoet, J. Castrop, B. Hageman, I.W. Mattaj et L.B. van de Putte (1990). Anti-(U1) small nuclear RNA antibodies in anti-small nuclear ribonucleoprotein sera from patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.* 86:2154-2160.
- Whittingham, S. (1992). B-cell epitopes of La and Ro autoantigens. *Mol. Biol. Reports* 16:175-181.
- Wilusz, J. et J.D. Keene (1986). Autoantibodies specific for U1 RNA and initiator methionine tRNA. *J. Biol. Chem.* 261: 5467-5472.
- Wolin, S.L. et J.A. Steitz (1983). Genes for two small cytoplasmic Ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 32:735-744.
- Wolin, S.L. et J.A. Steitz (1984). The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1996-2000.
- Yamagata, H., J.B. Harley et M. Reichlin (1984). Molecular properties of the Ro/SSA antigen and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for quantitation of antibody. *J. Clin. Invest.* 74:625-633.
- Yanish-Perron, C., J. Vierra et J. Messing (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Zuker, M. et P. Stiegler (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 9:133-148.

ANNEXE 1

Programme de PCR "Touchdown" (Don et al., 1991)

Étape 1.	94°C, 1.5 min.	71°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 2.	94°C, 1.5 min.	69°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 3.	94°C, 1.5 min.	67°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 4.	94°C, 1.5 min.	65°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 5.	94°C, 1.5 min.	63°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 6.	94°C, 1.5 min.	61°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 7.	94°C, 1.5 min.	59°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 8.	94°C, 1.5 min.	57°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 9.	94°C, 1.5 min.	55°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 10.	94°C, 1.5 min.	53°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 11.	94°C, 1.5 min.	51°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 12.	94°C, 1.5 min.	50°C, 2 min.	72°C, 3 min.
Étape 13.	répéter 15 fois l'étape 12		
Étape 14.	72°C, 15 min.		
Étape 15.	4°C, 12 heures		